



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ  
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ  
ΤΟΜΕΑΣ Ι: ΤΟΜΕΑΣ ΧΗΜΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΟΡΓΑΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

Διπλωματική εργασία

Φυσικοί Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες ως πλαστικοποιητές και τροποποιητές μηχανικών ιδιοτήτων βιοσυμβατών πρωτεϊνικών φιλμ

Μπαγάκη Δήμητρα Αντωνία

Υπό την επίβλεψη της Καθηγήτριας Αναστασίας Δέτση

ΑΘΗΝΑ, 2022

## Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική αποτελεί καινοτόμο ερευνητικό έργο που αφορά την εργαστηριακή μελέτη της ιδέας «Παραγωγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας από απόβλητα της γαλακτοβιομηχανίας: Αξιοποίηση του τυρογάλακτος με χρήση βιοσυμβατών πράσινων διαλυτών» η οποία διακρίθηκε στον 2<sup>ο</sup> Διαγωνισμό Καινοτομίας της FrieslandCampina Hellas «NOYNOY Idea Challenge Sustainability-Βιωσιμότητα» (2020-2021) που συμμετείχα μαζί με την ερευνητική ομάδα της καθηγήτριας Αναστασίας Δέτση, Η διπλωματική εργασία εκπονήθηκε κατά το ακαδημαϊκό έτος 2021-2022 στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας της Σχολής Χημικών Μηχανικών ΕΜΠ.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά της υπεύθυνη καθηγήτρια Αναστασία Δέτση για τη δυνατότητα εκπόνησης της διπλωματικής μου στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας, βοηθώντας με να εξοικειωθώ με καινοτόμες τεχνολογίες και εργαλεία γύρω από την Πράσινη Χημεία και Τεχνολογία. Παράλληλα, θα ήθελα να ευχαριστήσω απεριόριστα την Δρ. Ανδρομάχη Τζάνη για την απαραίτητη καθοδήγηση της, τις πολύτιμες συμβουλές της σύμφωνα με την εμπειρία και τις γνώσεις της και την καθημερινή υποστήριξή της καθόλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διπλωματικής εργασίας μου. Ήταν πολύ σημαντική για μένα, η ελευθερία που μου δόθηκε, τόσο από την Καθ. Α. Δέτση όσο και από την Δρ. Α. Τζάνη, στον πειραματικό σχεδιασμό και στην πειραματική μεθοδολογία προκειμένου να έρθω ένα βήμα πιο κοντά με τον τρόπο εργασίας ενός ερευνητή και την αναζήτηση καινοτομίας. Επιπλέον, ευχαριστώ θερμά όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας για την ομαλή διεξαγωγή της ερευνητικής αυτής μελέτης σε ένα άριστο κλίμα συνεργασίας. Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα εργαστήρια Πολυμερών και Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων μου για την απαραίτητη βοήθεια τους στην παροχή οργάνων και τη διεξαγωγή των απαιτούμενων αναλύσεων. Τέλος, θα ήθελα να αναφέρω ότι είμαι ευγνώμων για την πολύτιμη και απαραίτητη βοήθεια που μου προσέφερε η οικογένεια μου καθόλη τη διάρκεια των σπουδών μου στη σχολή Χημικών Μηχανικών.

## Περίληψη

Η στροφή προς ένα βιώσιμο, πράσινο τρόπο ζωής αποτελεί αδήριτη ανάγκη για την προστασία του περιβάλλοντος και την βελτίωση της ποιότητας της ζωής. Στο πλαίσιο της ανάγκης παραγωγής νέων υλικών ικανών να αντικαταστήσουν αποτελεσματικά τα πετροχημικής προέλευσης πλαστικά, πραγματοποιείται σημαντική στροφή του ενδιαφέροντος τόσο της ερευνητικής κοινότητας όσο και της βιομηχανίας σε πράσινες πρακτικές και διεργασίες για την ανάπτυξη βιώσιμων υλικών συσκευασίας όπως οι βιοδιασπώμενες ή/και βιοσυμβατές μεμβράνες/φιλμ.

Η βιομηχανία τροφίμων είναι μία από τις κύριες βιομηχανίες που χρησιμοποιούν μεγάλες ποσότητες πλαστικών για συσκευασία επομένως οι ανανεώσιμες και βιώσιμες εναλλακτικές στη συσκευασία και την επικάλυψη υλικών προσελκύουν μεγάλο ενδιαφέρον. Ανάμεσα σε διάφορα βιο-πολυμερή, τα πρωτεϊνικά πολυμερή έχουν μελετηθεί με μεγαλύτερο ενδιαφέρον καθώς οι αναφορές στη βιβλιογραφία που αφορούν σε αυτά αυξάνονται ταχέως. Στο πλαίσιο αναζήτησης πράσινων τεχνικών, μεθοδολογιών και στην ανάγκη για κυκλικότητα στις διεργασίες, φαίνεται πως πολλά παραπροϊόντα ή/και απόβλητα της βιομηχανίας τροφίμων είναι πόροι που δίνουν ευκαιρίες έξυπνης αξιοποίησης και παραγωγής καινοτόμων προϊόντων.

Όσον αφορά τη γαλακτοβιομηχανία, ο ορός γάλακτος αποτελεί το σημαντικότερο απόβλητο της καθώς εμφανίζεται σε μεγάλες ποσότητες κατά την παραγωγή γαλακτοκομικών προϊόντων. Καθώς διατηρεί πολλά από τα θρεπτικά συστατικά του γάλακτος, ο ορός έχει υψηλό οργανικό φορτίο, γεγονός που καθιστά απαγορευτική την άμεση διάθεσή του στο περιβάλλον. Ωστόσο, η σύνθεσή του προσφέρει την προοπτική να αντιμετωπιστεί ως πρώτη ύλη αντί ως απόβλητο και ειδικότερα οι πρωτεΐνες του μπορούν να αποτελέσουν τη βάση στο σχεδιασμό νέων προϊόντων.

Στο πλαίσιο αυτό, στόχος αυτής της μελέτης είναι η ανάπτυξη βιοσυμβατών πρωτεϊνικών φιλμ κατάλληλα για επικαλύψεις και συσκευασία τροφίμων. Για την παρασκευή των φιλμ αυτών, προτείνεται η χρήση τόσο πρωτεϊνών του γάλακτος, όπως την καζεΐνη όσο και πρωτεϊνών που βρίσκονται σε παραπροϊόντα γάλακτος όπως τις πρωτεΐνες ορού γάλακτος (whey protein isolate, WPI). Παρά την πρόοδο στην ανάπτυξη πρωτεϊνικών μεμβρανών ως υλικά συσκευασίας, οι μηχανικές τους ιδιότητες παραμένουν κατώτερες από εκείνες των συνθετικών μεμβρανών. Για τον λόγο αυτό, στην παρούσα εργασία, επιλέχθηκε να μελετηθεί η χρήση βιοσυμβατών και στοχευμένα σχεδιασμένων πράσινων διαλυτών όπως οι βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες φυσικής προέλευσης (Natural Deep Eutectic Solvents, NADES) ως πλαστικοποιητές που επιδρούν σημαντικά και συχνά βελτιώνοντας τις επιθυμητές ιδιότητες των μεμβρανών.

Οι βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες αποτελούν μίγμα το οποίο αποτελείται από δύο τουλάχιστον συστατικά, ένα δέκτη δεσμού υδρογόνου (HBA) και ένα δότη δεσμού υδρογόνου (HBD) οι οποίοι αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και δημιουργούν μια νέα ευτηκτική φάση με σημείο τήξης πολύ χαμηλότερο από αυτό του κάθε συστατικού. Σε αυτή την διπλωματική εργασία, παρασκευάστηκαν έξι NADES από φυσικά και χαμηλού κόστους συστατικά με τη μέθοδο θέρμανσης και ανάδευσης. Ως HBD χρησιμοποιήθηκε η γλυκερόλη ενώ ως HBA χρησιμοποιήθηκαν η βεταΐνη, η χλωριούχος χολίνη, η προλίνη και το οξικό νάτριο. Ο σχεδιασμός των NADES έγινε στοχευμένα, ώστε ο NADES να έχει πλαστικοποιητικό χαρακτήρα αλλά και να αποτελεί και παράγοντα που επιδρά στις μηχανικές ιδιότητες των φιλμ.

Όλα τα NADES χαρακτηρίστηκαν δομικά χρησιμοποιώντας φασματοσκοπία FTIR ενώ προσδιορίστηκαν επίσης μερικές από τις πιο σημαντικές ιδιότητές τους, όπως το pH και η πολικότητα τους. Αποδείχτηκε ότι οι διαλύτες με βασικό pH, δηλαδή οι NADES Bet-Gly 1:2 και Bet-Gly-W 1:2:1, και με σχεδόν ουδέτερο pH, δηλαδή οι NADES Pro-Gly 1:2 και Sodium Acetate-Gly 1:9, σχηματίζουν φιλμ σε κατάλληλη αναλογία ενώ οι διαλύτες με όξινο pH, δηλαδή οι ChCl-Gly 1:2 και ChCl-Gly-W 1:2:1 δεν προσφέρουν ικανοποιητική πλαστικοποίηση στα φιλμ.

Τα πρωτεϊνικά φιλμ σχηματίστηκαν χρησιμοποιώντας τη μέθοδο χύτευσης διαλύματος (casting) με ρυθμισμένο pH και τα NADES σε διάφορες συγκεντρώσεις ως πλαστικοποιητές. Τα φιλμ χαρακτηρίστηκαν με χρήση φασματοσκοπίας FT-IR και αξιολογήθηκαν επίσης το βάρος, το πάχος, η διαπερατότητα υδρατμών (WVP), η διαλυτότητα σε νερό (WS) και μηχανικές ιδιότητες όπως προέκυψαν από μετρήσεις ανάλυσης υψής (Burst Strength, Distance at Burst, ελαστικότητα, συνεκτικότητα, ανθεκτικότητα, προσκολλησιμότητα). Μετά την μελέτη των ιδιοτήτων των σχηματισμένων πρωτεϊνικών φιλμ, αποδείχθηκε ότι οι αυτές επηρεάζονται σημαντικά τόσο από τον τύπο της πρωτεΐνης όσο και από το είδος και τη συγκέντρωση του χρησιμοποιούμενου πλαστικοποιητή. Μεταξύ των NADES που μελετήθηκαν, οι πιο αποτελεσματικοί πλαστικοποιητές ήταν αυτοί που είχαν ως συστατικά γλυκερόλη σε συνδυασμό με βεταΐνη καθώς και σε συνδυασμό με L-προλίνη. Επιπλέον, μελετήθηκαν οι ιδιότητες φιλμ καζεΐνης με εκχύλισμα χαμομηλιού που προέκυψε έπειτα από εκχύλιση με NADES, ως προς τη διαδικασία σχηματισμού φιλμ και απέδειξαν ότι μπορεί να βελτιώσει κάποιες τις επιθυμητές ιδιότητες όπως ανθεκτικότητα και προσκολλησιμότητα.

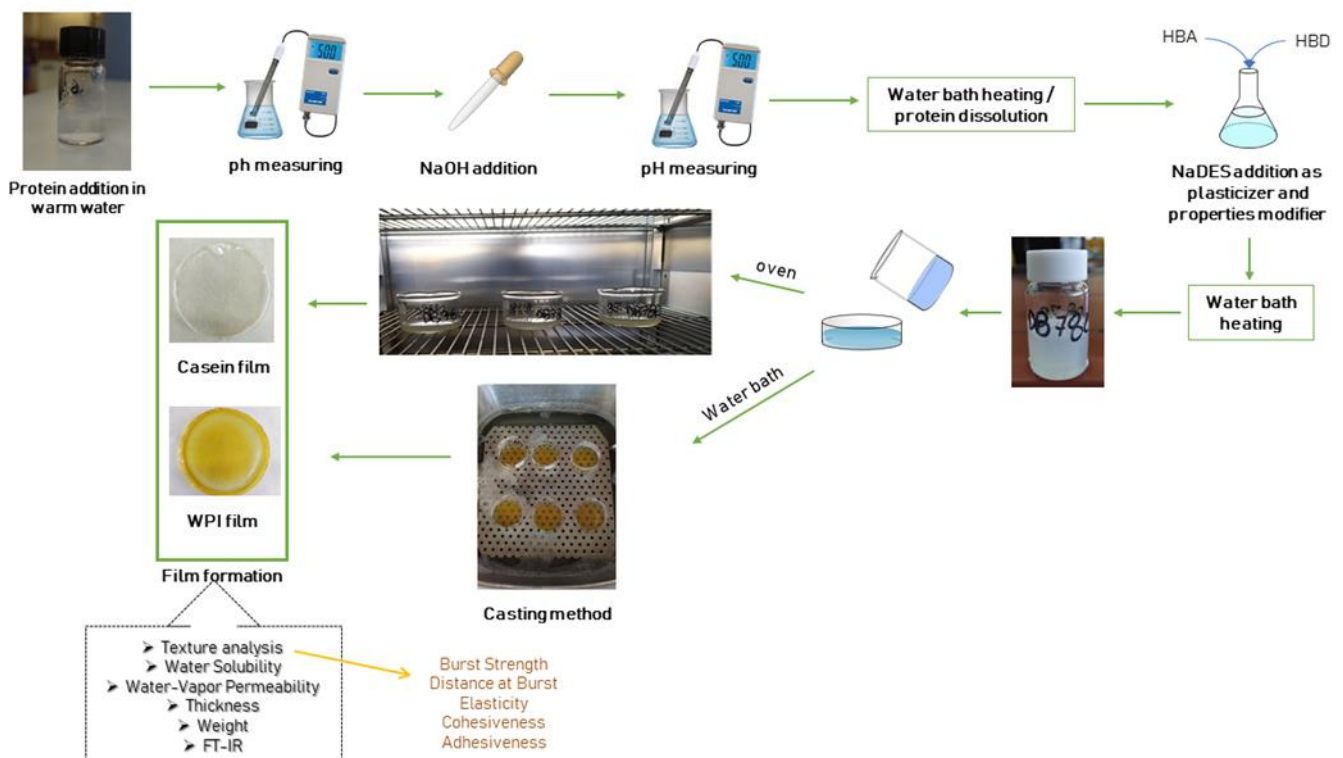
Αποδείχτηκε ότι τα φιλμ WPI έχουν μεγαλύτερη διαπερατότητα υδρατμών (WVP) από τα φιλμ καζεΐνης με ίδιο πλαστικοποιητή. Την μικρότερη διαπερατότητα υδρατμών έχουν τα φιλμ καζεΐνης με πλαστικοποιητή το NADES Pro-Gly 1:2 ενώ το φιλμ με εκχύλισμα χαμομηλιού έχει μειωμένη WVP. Παρόλα αυτά το WVP των φιλμ είναι εντός βιβλιογραφικών ορίων σε χαμηλές τιμές, δηλαδή από 2.6 έως 7.7 · 10<sup>-10</sup> g / (m s Pa), και οι NADES βοηθούν στη μείωση της διαπερατότητας των φιλμ. Επιπλέον, τα φιλμ καζεΐνης είναι πλήρως υδατοδιαλυτά σε αντίθεση με τα φιλμ WPI. Όμως, τα φιλμ καζεΐνης με πλαστικοποιητή NADES είναι πιο σκληρά και εύθραυστα σε σχέση με τα φιλμ καζεΐνης με πλαστικοποιητή τα φυσικά μίγματα των αντίστοιχων NADES και με τα φιλμ WPI. Τα φιλμ καζεΐνης με πλαστικοποιητή NADES είχαν δύναμη θραύσης (Burst Strength) έως και 1617.9 N ενώ τα φιλμ με WPI έως 551.8 N.

Για λόγους σύγκρισης, σχηματίστηκαν επίσης πρωτεϊνικά φιλμ χρησιμοποιώντας τη γλυκερόλη ως τον πιο συνηθισμένο συμβατικό πλαστικοποιητή, όπου επιβεβαιώθηκε η καλύτερη πλαστικοποίηση και οι βελτιωμένες ιδιότητες των φιλμ με NADES, και φιλμ με τα φυσικά μίγματα των αντίστοιχων συστατικών των NADES. Τα φιλμ καζεΐνης με πλαστικοποιητή τα φυσικά μίγματα των αρχικών συστατικών των NADES, έδωσαν φιλμ με σημαντικές διαφορές από τα αντίστοιχα φιλμ με χρήση NADES καθώς είχαν χειρότερες μηχανικές ιδιότητες και μικρότερη διαπερατότητα υδρατμών. Επιπλέον, σε μια προσπάθεια δημιουργίας πρωτεϊνικών φιλμ με προστιθέμενη αξία, διερευνήθηκε πως δρα ένα εκχύλισμα χαμομηλιού, που προέκυψε από πράσινη εκχύλιση με εκχυλιστικό μέσο το NADES, ως πλαστικοποιητής. Το φιλμ καζεΐνης με πλαστικοποιητή το εκχύλισμα-NADES οδήγησε σε μικρότερη WVP αλλά με ελάχιστα χειρότερες μηχανικές ιδιότητες σε σχέση με το φιλμ με χρήση του σκέτου NADES.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε μια προκαταρκτική μελέτη εφαρμογής των φιλμ καζεΐνης ως μεμβράνες επικάλυψης τροφίμων. Για τη μελέτη αυτή εφαρμόστηκε ως επικάλυψη σε ένα κομμάτι καρότο και ένα κομμάτι κίτρινο τυρί (α) καμία (β) συμβατική πλαστική μεμβράνη (γ) το φιλμ καζεΐνης με πλαστικοποιητή το NADES (Bet:Gly:W 1:2:1)-εκχύλισμα χαμομηλιού και (δ) το φιλμ καζεΐνης με πλαστικοποιητή το NADES Bet:Gly:W 1:2:1 . Από τη μελέτη αυτή, παρατηρήθηκε ότι τα φιλμ έδρασαν προστατευτικά ως προς την απομάκρυνση υγρασίας από τα τρόφιμα, δηλαδή τα κομμάτια καρότου και τυριού, χωρίς να ξεπεράσουν την προστασία που παρέχει η συμβατική εμπορική πλαστική μεμβράνη. Αποδείχτηκε ακόμα ότι η επικάλυψη του φιλμ με εκχύλισμα χαμομηλιού προσέφερε μειωμένη απώλεια υγρασίας από το τρόφιμο σε σχέση με το αντίστοιχο φιλμ καζεΐνης με NADES.

**Λέξεις Κλειδιά:** Πράσινη Χημεία, Φυσικοί Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες, Βιοσυμβατά Φιλμ, Πρωτεϊνικά Φιλμ, Βιοπολυμερή, Καζεΐνη, Πρωτεΐνες ορού γάλακτος, Ορός γάλακτος

## Graphical Abstract



## Abstract

Turning to a sustainable, green lifestyle is an urgent need to protect the environment and improve the quality of life. In the context of the need to produce new materials capable of effectively replacing petroleum-based plastics, there is a significant shift in the interest of both the research community and industry in green practices and processes for developing sustainable packaging materials such as biodegradable and / or biocompatible films.

The food industry is one of the main industries that use large amounts of plastics for packaging thus the renewable and sustainable alternatives in packaging and coating materials is of great interest. Among various biopolymers, protein polymers have been studied with greater interest as the references to them in the literature are multiplying. In the search for green techniques, methodologies and the need for circular processes, it seems that many by-products and / or waste of the food industry are resources that provide opportunities for smart utilization and production of innovative products.

Regarding the dairy industry, the cheese whey consists an important by-product as it occurs in large amounts during the production of dairy products. As it retains many of the nutrients of milk, cheese whey has a high content of organic material, which makes its direct disposal into the environment, prohibitive. However, its composition offers the prospect of being treated as a raw material instead of just a waste and in particular its proteins can be the basis in the design of new products.

In this context, the aim of this study is to develop biocompatible protein films suitable for food coating and/or packaging applications. For the preparation of these films, it is recommended to use both milk proteins, such as casein, and proteins found in milk by-products such as whey protein isolate (WPI). Despite the advances in the development of protein films as packaging materials, their mechanical properties remain inferior to those of plastic films. Therefore, in the present study, it was chosen to study the use of biocompatible and task-specifically designed green solvents such as Natural Deep Eutectic Solvents (NADES) as plasticizers that improve the desired properties of membranes.

Deep eutectic solvents are a mixture of at least two components, a hydrogen bond acceptor (HBA) and a hydrogen bond donor (HBD) which interact to form a new eutectic phase with a melting point much lower than that of each component. In this thesis, six NADES were synthesized out of natural and low-cost ingredients by heating and stirring. Glycerol was used as HBD while betaine, choline chloride, proline and sodium acetate were used as HBA. The design of NADES was performed in a targeted way, so that NADES has a plasticizing character but also serves as a property modifier of the films.

All NADES were structurally characterized using FTIR spectroscopy and some of their most important properties, such as pH and polarity, were also determined. Solvents with a basic pH (NADES Bet-Gly 1: 2 and Bet-Gly-W 1: 2: 1) and almost neutral pH (NADES Pro-Gly 1: 2 and Sodium Acetate-Gly 1 : 9), form a film in the appropriate ratio while the solvents with acidic pH (ChCl-Gly 1: 2 and ChCl-Gly-W 1: 2: 1) do not offer satisfactory plasticization to the films.

Protein films were formed using the pH-adjusted casting method and NADES at various concentrations as plasticizers. The films were characterized using FT-IR spectroscopy and their weight, thickness, water vapor permeability (WVP), water solubility (WS) and mechanical properties as assessed by texture analysis measurements (Burst Strength, Distance at Burst, cohesiveness, elasticity, resilience, adhesiveness) were also evaluated. After studying the properties of the formed protein films, it turned out that they are significantly affected both by the type of protein and by the type and concentration of the plasticizer used. Among the NADES studied, the most effective plasticizers were those containing glycerol in combination with betaine as well as in combination with L-proline. In addition, the properties of casein film with chamomile extract resulting from NADES

extraction were studied in terms of the film formation process and demonstrated that it can improve some of the desired properties such as resilience and adhesiveness.

WPI films have been shown to have higher water vapor permeability (WVP) than casein films with the same plasticizer. Casein films with plasticizer NADES Pro-Gly 1: 2 have the lowest water vapor permeability, while film with chamomile extract has reduced WVP. However, the WVP of the films is within the bibliographic limits at low values, from 2.6 to  $7.7 \cdot 10^{-10}$  g / (m s Pa), and NADES helps to reduce the permeability of the films. In addition, casein films are completely water soluble in contrast to WPI films. However, casein films with NADES as plasticizer are tougher and more brittle than casein film prepared using the physical mixtures of the original components of the respective NADES as plasticizer and WPI films. Casein films with NADES as plasticizer had Burst Strength up to 1617.9 N while films with WPI up to 551.8 N.

For comparison purposes, protein films were also formed using glycerol as the most common conventional plasticizer, confirming the best plasticizing ability and improved properties of NADES films, and films with natural mixtures of the corresponding NADES ingredients. Casein films prepared using the physical mixtures of the original components of the respective NADES as plasticizer, lead to films with significant differences from the film made with NADES, as they had worse mechanical properties and lower water vapor permeability. In addition, in order to study the development of an active coating system, the selected as optimum NADES in respect of the film forming process, was used as an extraction solvent for the extraction of bioactive compounds from chamomile, and then the added-value NADES-extract was effectively used for the formation of a protein film with desirable properties. The casein film with NADES-extract resulted in lower WVP but slightly worse mechanical properties than the film that contains pure NADES.

Finally, a preliminary study of the application of casein films as food-coating films was carried out. For this study it was applied as a coating on a piece of carrot and a piece of yellow cheese (a) nothing (b) conventional plastic film (c) the casein film with plasticizer NADES (Bet: Gly: W 1: 2: 1) - chamomile extract and (d) the casein film with plasticizer NADES Bet: Gly: W 1: 2: 1. From this study, it was observed that the films acted protectively in terms of removing moisture from food, that is the carrot and cheese pieces, without exceeding the protection provided by the conventional commercial plastic film. It was also shown that the film with NADES-chamomile extract reduced moisture loss from the food compared to the corresponding casein film with NADES.

**Keywords:** Green Chemistry, Natural Deep Eutectic Solvents, Biocompatible Films, Protein Films, Biopolymers, Casein, Whey Proteins, Whey

## Περιεχόμενα

1. Θεωρητικό μέρος.....	9
1.1 Ορός γάλακτος ως απόβλητο της γαλακτοβιομηχανίας .....	9
1.1.1 Αξιοποίηση αποβλήτου.....	9
1.1.2 Θρεπτική αξία και σύσταση ορού γάλακτος .....	11
1.1.3 Ταξινόμηση των ορών γάλακτος .....	12
1.1.4 Επεξεργασία του ορού γάλακτος .....	13
1.2 Πρωτεΐνες γάλακτος.....	14
1.2.1 Καζεΐνη .....	15
1.2.2 Πρωτεΐνες ορού γάλακτος .....	16
1.3 Βιοπολυμερή.....	18
1.3.1 Πρωτεϊνικά βιοπολυμερή.....	19
1.3.2 Πλαστικοποιητές.....	22
1.3.3 Εφαρμογές στην συσκευασία τροφίμων.....	23
1.4 Φυσικοί Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες (NADES) .....	26
1.4.1 Ορισμός και ιδιότητες.....	26
1.4.2 Πλεονεκτήματα .....	30
1.4.3 Χρήσεις .....	31
1.4.4 Εφαρμογή στη βιομηχανία τροφίμων .....	32
1.4.5 Βιοπολυμερικά φιλμ με NADES.....	33
2. Πειραματικό μέρος .....	34
2.1. Όργανα και Υλικά .....	34
2.2. Σύνθεση NADES.....	35
2.2.1 NADES Betaine : Glycerol 1:2 (Bet-Gly 1:2).....	35
2.2.2 NADES Betaine : Glycerol : Water 1:2:1 (Bet-Gly-W 1:2:1) .....	35
2.2.3 NADES Choline Chloride : Glycerol 1:2 (ChCl-Gly 1:2) .....	35
2.2.4 NADES Choline Chloride : Glycerol : Water 1:2:1 (ChCl-Gly-W 1:2:1) .....	35
2.2.5 NADES L-Proline : Glycerol 1:2 (Pro-Gly 1:2).....	36
2.2.6 NADES Sodium acetate : Glycerol 1:9 (Sodium Acetate-Gly 1:9).....	36
2.3. Χαρακτηρισμός NADES.....	37
2.3.1 Μέτρηση pH.....	37
2.3.2 Μέτρηση πολικότητας .....	37
2.3.3 Φασματοσκοπία υπέρυθρου FT-IR (ATR) .....	37
2.4. Μελέτη διαλυτότητας καζεΐνης στους NADES.....	38
2.4.1 Δοκιμές διάλυσης καζεΐνης.....	38
2.4.2 Καμπύλη καζεΐνης.....	38



2.5. Σχηματισμός βιοσυμβατών πρωτεϊνικών φιλμ .....	39
2.5.1 Γενική μέθοδος παρασκευής φιλμ καζεΐνης .....	39
2.5.2 Γενική μέθοδος παρασκευής φιλμ πρωτεϊνών ορού γάλακτος .....	42
2.6. Χαρακτηρισμός φιλμ .....	44
2.6.1 Μέτρηση μάζας .....	44
2.6.2 Μέτρηση πάχους .....	44
2.6.3 Μέτρηση διαπερατότητας υδρατμών .....	44
2.6.4 Μέτρηση διαλυτότητας .....	45
2.6.5 Φασματοσκοπία υπερύθρου FT-IR (ATR) .....	46
2.6.6 Ανάλυση υφής .....	46
2.7 Προκαταρκτική μελέτη εφαρμογής χρήσης φιλμ για επικάλυψη τροφίμου .....	48
3. Αποτελέσματα-Συζήτηση .....	51
3.1 Σύνθεση NADES .....	51
3.2 Χαρακτηρισμός NADES .....	52
3.2.1 Μέτρηση pH .....	52
3.2.2 Μέτρηση πολικότητας .....	54
3.2.3 Φασματοσκοπία υπερύθρου FT-IR (ATR) .....	54
3.3 Μελέτη διαλυτότητας καζεΐνης .....	58
3.3.1 Δοκιμές διάλυσης καζεΐνης .....	58
3.3.2 Καμπύλη καζεΐνης .....	59
3.4 Σχηματισμός βιοσυμβατών πρωτεϊνικών φιλμ .....	60
3.4.1 Φιλμ καζεΐνης .....	60
3.4.2 Φιλμ πρωτεϊνών ορού γάλακτος .....	66
3.5 Χαρακτηρισμός φιλμ .....	69
3.5.1 Μέτρηση μάζας και πάχους .....	69
3.5.2. Μέτρηση διαπερατότητας υδρατμών .....	72
3.5.3 Μέτρηση διαλυτότητας .....	75
3.5.4 Ανάλυση υφής .....	76
3.5.5 Φασματοσκοπία υπερύθρου FT-IR (ATR) .....	83
3.6 Διερεύνηση εφαρμογής των φιλμ ως μεμβράνες επικάλυψης τροφίμων .....	91
4. Συμπεράσματα .....	99
5. Προτάσεις για το μέλλον .....	102
Βιβλιογραφία .....	104
Παράρτημα .....	107

# 1. Θεωρητικό μέρος

## 1.1 Ορός γάλακτος ως απόβλητο της γαλακτοβιομηχανίας

Ο ορός γάλακτος ή τυρόγαλα παράγεται ως παραπροϊόν κατά την επεξεργασία τυροκομικών και την παραγωγή καζεΐνης και αποτελεί σημαντικό απόβλητο της γαλακτοβιομηχανίας. Διατηρεί πολλά από τα θρεπτικά στοιχεία του γάλακτος αλλά διαθέτει υψηλό οργανικό φορτίο που καθιστά πλέον απαγορευτική την απευθείας διάθεση του στο περιβάλλον. Συνεπώς, η διαχείριση και η περαιτέρω αξιοποίηση του, αποτελεί ζητούμενο για τη γαλακτοβιομηχανία. Η λύση στο ζητούμενο αυτό, βρίσκεται στη σύσταση του τυρογάλακτος, καθώς η πληθώρα των θρεπτικών συστατικών που διαθέτει, του προσφέρει την προοπτική να αντιμετωπιστεί ως πρώτη ύλη και όχι μόνο ως απόβλητο όπως συνέβαινε στο παρελθόν.

Συγκεκριμένα, ο ορός γάλακτος ορίζεται ως το υδαρές μέρος του γάλακτος που παραμένει μετά τον διαχωρισμό του τυρογάλακτος που προκύπτει από την πήξη του γάλακτος από όξινα ή πρωτεολυτικά ένζυμα.<sup>[2]</sup> Η τυπική σύσταση του γάλακτος εμπεριέχει 3.6% πρωτεϊνών, από τις οποίες η καζεΐνη αποτελεί το 80% και το 20% αφορά πρωτεΐνες ορού γάλακτος (whey proteins).<sup>[1]</sup> Ο ορός γάλακτος λαμβάνεται μετά την αφαίρεση της καζεΐνης από το γάλα. Η καζεΐνη μπορεί να διαχωριστεί από το γάλα με οξίνιση σε pH 4.6, με χρήση πρωτεολυτικών ενζύμων, όπως η χυμοσίνη, ή με μικροδιήθηση. Η οξίνιση του γάλακτος μπορεί να επιτευχθεί με μικροβιακή ζύμωση της λακτόζης σε γαλακτικό οξύ ή με την προσθήκη οργανικών ή ανόργανων οξέων.<sup>[4]</sup>

Ο ορός γάλακτος και οι πρωτεΐνες ορού γάλακτος έχουν διαφορετικές βιολογικές και λειτουργικές ιδιότητες.<sup>[1]</sup> Οι πρωτεΐνες ορού γάλακτος χρησιμοποιούνται για την παρασκευή διαφόρων προϊόντων όπως βρεφικές τροφές, διατροφικά προϊόντα για αθλητές, εξειδικευμένα προϊόντα για τον έλεγχο της παχυσαρκίας, έλεγχο της διάθεσης και άλλα κλινικά συμπληρώματα πρωτεΐνης όπως για εντερικές διαταραχές.<sup>[1]</sup> Ακόμη, ο ορός γάλακτος και τα προϊόντα ορού γάλακτος χρησιμοποιούνται σε ζωοτροφές, ψωμί, είδη ζαχαροπλαστικής, καραμέλες και ποτά.<sup>[3]</sup>

### 1.1.1 Αξιοποίηση αποβλήτου

Στατιστικά, το ένα τρίτο των τροφίμων που παράγονται (περίπου 1,3 δισεκατομμύρια τόνοι) στον κόσμο για ανθρώπινη κατανάλωση σπαταλάται ετησίως. Η εξάλειψη των υπολειμμάτων και των υποπροϊόντων τροφίμων αποτελεί σοβαρή απειλή για το περιβάλλον λόγω της υψηλής περιεκτικότητας τους σε άζωτο και φώσφορο. Ωστόσο, τα απόβλητα και τα παραπροϊόντα τροφίμων περιέχουν ορισμένα πολύτιμα προϊόντα, όπως πρωτεΐνες και φαινολικές ενώσεις που μπορούν να επαναχρησιμοποιηθούν για τη μείωση της περιβαλλοντικής ρύπανσης.<sup>[13]</sup>

Ιστορικά, ο ορός γάλακτος θεωρούνταν απόβλητο της τυροκομίας και της παραγωγής καζεΐνης. Η διάθεση του στο περιβάλλον αποτέλεσε δύσκολο πρόβλημα καθώς ο ορός γάλακτος αποτελεί περίπου το 90% του αρχικού γάλακτος προς επεξεργασία. Παλαιότερα, ο ορός γάλακτος συνήθως απορρίπτονταν σε συστήματα αποχέτευσης ή σε υδάτινους αποδέκτες όπως λίμνες, ποτάμια και ωκεανούς προκαλώντας σημαντικά προβλήματα περιβαλλοντικής ρύπανσης λόγω υψηλού βιοχημικά απαιτούμενου οξυγόνου (BOD) του ορού. Το BOD του ορού γάλακτος εκτιμάται ότι είναι >35.000 mg/L και το COD 60.000-80.000

ppm. Εναλλακτικά, ο ορός γάλακτος ψεκάζοταν σε γεωργικές εκτάσεις ως λίπασμα, αλλά οδήγησε σε μόλυνση των υπόγειων υδάτων καθώς έχει υψηλό οργανικό φορτίο και έντονη οσμή. Η πιο επικερδής και αβλαβής μέθοδος διάθεσης ορού γάλακτος στο παρελθόν ήταν η χρήση του στις ζωοτροφές που συμβαίνει μέχρι και σήμερα αλλά δεν είναι πλήρως αποδοτική καθώς τα ενήλικα ζώα εμφανίζουν αδυναμία στην πέψη του.<sup>[4]</sup>

Με το πέρασμα των χρόνων, με τη βοήθεια της τεχνολογικής και επιστημονικής ανάπτυξης, ο ορός γάλακτος έχει μετατραπεί από ένα δύσκολο για διάθεση απόβλητο σε ένα υψηλής αξίας γαλακτοκομικό υποπροϊόν χάρη στα πλούσια συστατικά του. Πέρα από τα θρεπτικά συστατικά του ορού, η ενίσχυση των λειτουργικών ιδιοτήτων των τροφίμων λόγω της ενσωμάτωσης σε αυτά συστατικών με βάση τον ορό πραγματοποιείται όλο και περισσότερο από τη βιομηχανία τροφίμων. Ο ορός γάλακτος δεν αποτελεί πλέον υποπροϊόν αλλά πολύτιμο «συμπροϊόν» κατά την παραγωγή τυριού και καζεΐνης. Σε αυτή την μεταβολή συνέβαλε η αυξημένη παραγωγή τυριού, τα αυστηρότερα μέτρα ελέγχου της περιβαλλοντικής ρύπανσης, η πρόοδος της επιστήμης, η επέκταση της αγοράς και η αυξημένη ζήτηση των καταναλωτών για υγιεινά και θρεπτικά τρόφιμα.<sup>[4]</sup>

Η παραγωγή ορού γάλακτος παγκοσμίως εκτιμάται σε περίπου 180 έως 190·10<sup>6</sup> τόνους ανά έτος. Συνολικά 40·10<sup>6</sup> τόνοι ανά έτος ορού γάλακτος παράγονται στην Ευρωπαϊκή Ένωση. Για την παραγωγή 1-2 κιλών τυριού αποδίδονται 8-9 κιλά ορού γάλακτος και για κάθε 100 κιλά γάλα παράγεται 33 κιλά στραγγιστό γιαούρτι και 67 κιλά όξινος ορός.<sup>[6]</sup>

Η ερευνητική κοινότητα έχει στραφεί προς την αναζήτηση εναλλακτικών μεθόδων διαχείρισής του και αξιοποίησης των ωφέλιμων συστατικών του, όπως είναι:

- η απομόνωση των περιεχόμενων πρώτων υλών και κυρίως των πρωτεϊνών, με στόχο τη διάθεσή τους στη βιομηχανία αλλά και τη μείωση του οργανικού φορτίου του αποβλήτου
- η διάθεση του τυρογάλακτος ως συστατικό ζωοτροφών
- η δευτεροβάθμια επεξεργασία του με στόχο την παραγωγή δευτερογενών τυριών όπως μυζήθρα και ανθότυρο.

Συγκεκριμένα, περίπου το 50% της παγκόσμιας παραγωγής τυρογάλακτος υποβάλλεται σε επεξεργασία και μετατρέπεται σε διάφορα τρόφιμα και ζωοτροφές. Περίπου το ήμισυ αυτής της ποσότητας χρησιμοποιείται απευθείας σε υγρή μορφή, 30% σε σκόνη τυρογάλακτος, 15% ως λακτόζη και τα υποπροϊόντα της και το υπόλοιπο ως συμπυκνωμένη πρωτεΐνη τυρογάλακτος. Ο ορός γάλακτος περιέχει περισσότερα από τα μισά στερεά που υπάρχουν στο αρχικό πλήρες γάλα, συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών ορού γάλακτος (20% της συνολικής πρωτεΐνης) και της περισσότερης λακτόζης, υδατοδιαλυτών βιταμινών και μετάλλων.<sup>[6]</sup>

Λόγω της εξαιρετικής διατροφικής αξίας του ορού και της διευρυμένης εφαρμογής του, έχουν αναπτυχθεί πολλές νέες εμπορικές διεργασίες για την παραγωγή συστατικών υψηλής ποιότητας με βάση τον ορό γάλακτος. Κάποια από αυτά είναι οι σκόνες ορού γάλακτος (whey powders), τα συμπυκνώματα πρωτεΐνης ορού γάλακτος (whey protein concentrates), η απομονωμένη πρωτεΐνη ορού γάλακτος (whey protein isolate) και τα κλάσματα πρωτεΐνης ορού γάλακτος (whey protein fractions).<sup>[4]</sup>

Ο πιο συνηθισμένος τρόπος αξιοποίησης του τυρογάλακτος είναι η αναερόβια χώνευση του για παραγωγή βιοαερίου και γενικότερα η μετατροπή του σε ιλύ με στόχο την παραγωγή ενέργειας όμως αποτελεί λύση υψηλού κόστους.<sup>[7]</sup> Ακόμα, η λακτόζη του ορού μπορεί να

απομονωθεί με κρυστάλλωση για την παραγωγή φαρμακευτικής λακτόζης και τα προϊόντα ορού γάλακτος χρησιμοποιούνται σε είδη ζαχαροπλαστικής, αρτοποιίας, καραμέλες και ποτά.<sup>[5]</sup> Επιπλέον, παράγωγα του τυρογάλακτος χρησιμοποιούνται σε τεχνικά και φαρμακευτικά προϊόντα για την παραγωγή χρωστικών ουσιών, κολλών και καλλυντικών προϊόντων. Συγκεκριμένα, οι πρωτεΐνες γάλακτος έχουν αξιοποιηθεί κατά την παραγωγή ζυμαρικών, σε κρεατικά παρασκευάσματα και σε βρώσιμα φιλμ και επικαλυπτικά υλικά.<sup>[5]</sup>

Η ανάκτηση συστατικών υψηλής αξίας από απόβλητα και παραπροϊόντα τροφίμων μπορεί να προσφέρει μια φθηνότερη πηγή για την παραγωγή νέων προϊόντων και να χαρίσει μια νέα λειτουργία στα παραπροϊόντα.<sup>[13]</sup> Έτσι, η ανάκτηση των συστατικών του ορού γάλακτος κι η αξιοποίηση του μπορεί να είναι επωφελείς όχι μόνο για το περιβάλλον αλλά και για μια βιώσιμη οικονομία. Ενώ ο κύριος τομέας εφαρμογής των προϊόντων πρωτεΐνης γάλακτος θα συνεχίσει να είναι η χρήση τους ως λειτουργικά συστατικά σε συσκευασμένα τρόφιμα, είναι πιθανό να υπάρξει αυξημένη χρήση προϊόντων με βάση την πρωτεΐνη γάλακτος σε διαιτητικά, φαρμακευτικά και ιατρικά προϊόντα.<sup>[5]</sup>

Δεδομένου ότι η αξιοποίηση του ορού γάλακτος θα μελετηθεί ως προς την παραγωγή βιοπολυμερικών φιλμ για συσκευασία τροφίμων, αξίζει να σημειωθεί ότι η οικονομική παραγωγή συσκευασιών τροφίμων με βιολογική βάση απαιτεί υλικά που είναι άφθονα στη φύση. Έτσι, τα αγροτοβιομηχανικά παραπροϊόντα επανεκτιμώνται προκειμένου να χρησιμοποιηθούν ως πόροι για βιομηχανική χρήση και όχι ως απόβλητα.<sup>[14]</sup> Ειδικότερα, η χρήση του ορού πίσω στην βιομηχανία τροφίμων, όπως για παραγωγή βρεφικών τροφών και διατροφικών προϊόντων για αθλητές, WPC, WPI κλπ εφαρμόζει τις αρχές της κυκλικής οικονομίας καθώς και ανακτά ένα απόβλητο και το χρησιμοποιεί ως τροφοδοσία στην γραμμή παραγωγής (from waste to feed).

### 1.1.2 Θρεπτική αξία και σύσταση ορού γάλακτος

Τα κύρια θρεπτικά συστατικά του ορού γάλακτος είναι η β-λακτοσφαιρίνη η α-λακταλβουμίνη, αλβουμίνη ορού βοοειδών (BSA), λακτοφερίνη (Lf), ανοσοσφαιρίνες (Igs), ένζυμα λακτοϋπεροξειδάσης (Lp), γλυκομακροπεπίδια (GMP), λακτόζη και μέταλλα. Η σύνθεση του υγρού ορού γάλακτος εξαρτάται επίσης από την πηγή γάλακτος, π.χ., ο ορός γάλακτος που προέρχεται από ξινόγαλο περιέχει περισσότερη σφιγγομυελίνη λιπιδίων σε σύγκριση με εκείνους που προέρχονται από τυρί. Ο ορός γάλακτος είναι ένα δημοφιλές πρωτεϊνικό συμπλήρωμα διατροφής που είναι ευρέως γνωστό ότι προσφέρει αντιμικροβιακή δράση, ρύθμιση του ανοσοποιητικού, βελτιωμένη μυϊκή δύναμη και σωματική σύσταση. Επιπλέον, ο ορός γάλακτος είναι γνωστό ότι προλαμβάνει τις καρδιαγγειακές παθήσεις και την οστεοπόρωση.<sup>[1]</sup>

Ο υγρός ορός γάλακτος περιέχει περίπου 93-94% νερό, 5% λακτόζη, 0.7% πρωτεΐνες, 0.5% τέφρα και λιπαρά 0.1%. Επιπλέον, περιέχει το 93% του νερού στο γάλα και το 50% των συνολικών στερεών του γάλακτος.<sup>[4]</sup>

Η σύσταση του ορού γάλακτος διαφέρει ανάλογα με το είδος του τυριού που παράγεται και τη μέθοδο παρασκευής της καζεΐνης που χρησιμοποιείται. Κατά μέσο όρο, ο ορός γάλακτος περιέχει περίπου 65g/kg στερεών, τα οποία απαρτίζονται από 50g λακτόζη, 6g πρωτεϊνών, 6g τέφρας, 2g μη πρωτεϊνικού αζώτου και 0.5g λιπαρών. Το πρωτεϊνικό κλάσμα περιέχει περίπου 50% β-λακτοσφαιρίνη και 25% α-λακταλβουμίνη.<sup>[2]</sup> Το χρώμα του υγρού ορού γάλακτος εξαρτάται από την ποιότητα του γάλακτος και τον τύπο του γάλακτος που χρησιμοποιείται.<sup>[4]</sup>

### 1.1.3 Ταξινόμηση των ορών γάλακτος

Υπάρχουν διαφορές στην σύσταση του ορού ανάλογα με το αρχικό γάλα που παρέχεται και την διαδικασία παραγωγής που ακολουθείται. Ο ορός γάλακτος μπορεί να ταξινομηθεί σε ομάδες: <sup>[2][4]</sup>

- Γλυκός ορός: με pH 5.9-6.5
- Όξινος ορός: με pH < 5.0

Γενικά, οι οροί γάλακτος που παράγονται από τυριά ή καζεΐνη που έχουν πήξει με πυτιά αναπτύσσουν χαμηλά επίπεδα οξύτητας σε pH περίπου 6.0-6.5. Αυτός είναι ο γλυκός ορός γάλακτος που προκύπτει από την παραγωγή σκληρών και ημίσκληρων τυριών όπως το τυρί Cheddar. <sup>[4]</sup> Αντίθετα, η παραγωγή φρέσκων όξινων τυριών, όπως το Ricotta ή το τυρί Cottage ή το στραγγιστό γιαούρτι, παράγει ορούς γάλακτος μεσαίας οξύτητας ή όξινους. Ο ορός γάλακτος από καζεΐνες που παράγονται με προσθήκη οξέος ταξινομείται ως ορός γάλακτος με υψηλή περιεκτικότητα σε οξύ και έχει pH περίπου 4.6-5.0. <sup>[2]</sup>

Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται οι διαφορές των ειδών ορού επί της Ξηρής τους βάσης (Belitz, Grosch, Schieberle, 2009) <sup>[3]</sup>.

Πίνακας 1: Συστατικά γάλακτος και ορού σε % της Ξηρής βάσης <sup>[3]</sup>

Προϊόν	Ξηρή Μάζα (%)	Πρωτεΐνες (%)	Λακτόζη (%)	Μέταλλα (%)
Αποβουτυρωμένο γάλα	9.0	36	53	7
Ορός γάλακτος (από πήξη με πυτιά)	6.0-6.4	13	75	8
Ορός γάλακτος (από πήξη με οξέα)	5.8-6.2	12	67	14

Ο πιο διαδεδομένος ορός κατά την παραγωγή είναι ο γλυκός (sweet whey). Ο γλυκός ορός γάλακτος που παράγεται με χρήση πυτιάς για την πήξη των καζεϊνών περιέχει το γλυκομακροπεπτιδικό κλάσμα της κ-καζεΐνης. Ο όξινος ορός γάλακτος που παράγεται από την άμεση οξίνιση του γάλακτος στο ισοηλεκτρικό σημείο των καζεϊνών περιέχει υψηλότερα επίπεδα φωσφορικού ασβεστίου διαλυτοποιημένα σε χαμηλό pH. Η μεγαλύτερη παραγωγή όξινου ορού (acid whey) είναι από την παραγωγή του στραγγιστού γιαουρτιού. <sup>[4]</sup>

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι διαφορές του γλυκού και του όξινου ορού επί της υγρής τους βάσης (Bansal, Bhandari, 2016) <sup>[4]</sup>.

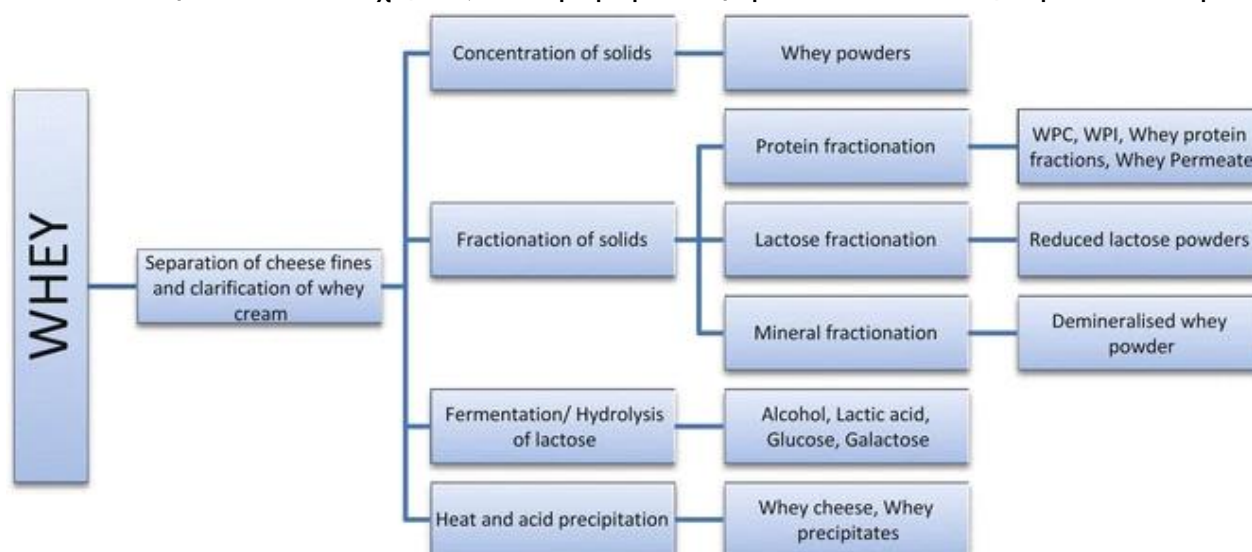
Πίνακας 2: Κατά προσέγγιση σύσταση γλυκού και όξινου ορού γάλακτος (g/L) <sup>[4][5]</sup>

Συστατικό (g/L)	Γλυκός ορός	Όξινος ορός
Ολικά στερεά	63.0-70.0	63.0-70.0
Ολική πρωτεΐνη	6.50-6.60	6.10-6.20
Μη πρωτεϊνικό άζωτο	0.27-0.37	0.30-0.40
Λακτόζη	46.0-52.0	44.0-47.0
Λιπαρά	0.20-0.50	0.30
Μέταλλα (τέφρα)	5.00-5.20	7.50-7.90
Ασβέστιο	0.40-0.60	1.20-1.60
Φωσφορικά	0.50-1.00	2.00
Νάτριο	0.50-0.53	0.50-0.51

## 1.1.4 Επεξεργασία του ορού γάλακτος

Ο ορός γάλακτος αποτελείται από πολύτιμα θρεπτικά συστατικά και πολλές νέες εμπορικές διαδικασίες έχουν αναπτυχθεί για την παραγωγή προϊόντων ορού γάλακτος υψηλής ποιότητας, όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Οι κύριες οδοί μέσω των οποίων ο υγρός ορός γάλακτος μπορεί να χρησιμοποιηθεί ή να μετατραπεί σε συστατικά με βάση τον ορό γάλακτος επισημαίνονται στο παρακάτω σχήμα.<sup>[4]</sup>

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 1, η παραγωγή διαφόρων συστατικών με βάση τον ορό



Σχήμα 1: Διεργασίες που εμπλέκονται στη μετατροπή ορού γάλακτος σε συστατικά με βάση τον ορό γάλακτος<sup>[4]</sup>

γάλακτος περιλαμβάνει συνδυασμό των παρακάτω βασικών σταδίων επεξεργασίας<sup>[4]</sup>:

- a) Αφαίρεση των μικρών σωματιδίων τυροπήγατος
- b) Διαχωρισμός για την απομάκρυνση των καταλοίπων από λίπος γάλακτος, γνωστό ως κρέμα ορού γάλακτος
- c) Συγκέντρωση των στερεών μέσω επεξεργασίας με μεμβράνες ή με εξάτμιση και ξήρανση προς παραγωγή σκόνης ορού γάλακτος
- d) Κλασματοποίηση στερεών με:
  - I. Ανάκτηση πρωτεϊνών για την παραγωγή συμπυκνωμάτων πρωτεΐνης ορού γάλακτος, απομονωμένων πρωτεϊνών ορού γάλακτος και πρωτεϊνικών κλασμάτων όπως λακτοϋπεροξειδάση, λακτοφερρίνη, α-λακταλβουμίνη και β-λακτοσφαιρίνη
  - II. Ανάκτηση λακτόζης για την παραγωγή της ίδιας και των προϊόντων ζύμωσης της
  - III. Απομετάλλωση για την παραγωγή απιονισμένης σκόνης ορού γάλακτος

Για την παραγωγή της σκόνης ορού (whey powder) από τον υγρό ορό γάλακτος υπάρχουν δύο πιθανές διαδικασίες στη βιομηχανία. Κατά τη μία διεργασία, πραγματοποιείται αρχική συμπύκνωση του ορού σε 50-55% ξηρή μάζα σε συστήματα εξάτμισης με υμένια (θερμική ή μηχανική συμπίεση ατμών) και ακολουθείται από ξήρανση με ψεκασμό. Κατά την δεύτερη διεργασία, πραγματοποιείται αρχική συμπύκνωση του ορού σε 21-25% ξηρή μάζα με αντίστροφη όσμωση (υπερδιήθηση) και ακολουθείται από

συμπύκνωση σε 50-55% ξηρής μάζας μέσω εξάτμισης με υμένια και ξήρανσης με ψεκασμό.<sup>[3]</sup>

Για την παραγωγή συμπυκνωμάτων ορού γάλακτος (WPC), πρέπει να αφαιρεθεί από τον ορό γάλακτος η λακτόζη, τα μέταλλα και το νερό έτσι ώστε το τελικό αποξηραμένο προϊόν να έχει ελάχιστη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη 25%. Τεχνικές που χρησιμοποιούνται συνήθως στη διαδικασία της συγκέντρωσης πρωτεΐνης είναι η υπερδιήθηση και η αραιωτική διήθηση. Το συμπύκνωμα πρωτεΐνης ορού γάλακτος παράγεται με τεχνικές διαχωρισμού όπως η καθίζηση, η διήθηση ή διάλυση. Το WPC συνήθως χαρακτηρίζεται με βάση την ποσότητα πρωτεΐνης σε ξηρή ύλη που περιέχει. Για παράδειγμα, το WPC-35 περιέχει 34-35 % πρωτεΐνη σε ξηρή ύλη. Τυπικά, η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη στις σκόνες WPC κυμαίνεται από 35 έως 80 %.<sup>[4][5]</sup>

Τα προϊόντα πρωτεΐνης ορού γάλακτος που περιέχουν  $\geq 90$  % πρωτεΐνη είναι γνωστά ως απομονωμένη πρωτεΐνη ορού γάλακτος (WPI). Η σκόνη WPI περιέχει 4-6% υγρασία, 0,2-2,0% λακτόζη, 0,2-1,5% λιπαρά και 0,3-4,5% τέφρα. Η κύρια διαφορά μεταξύ WPC και WPI είναι ότι το WPI περιέχει υψηλότερη πρωτεΐνη και αναλογικά χαμηλότερη περιεκτικότητα σε λακτόζη και μέταλλα από το WPC.<sup>[4]</sup> Για την παραγωγή WPI, τα λιπαρά αφαιρούνται από τον ορό γάλακτος με φυγοκέντρηση ή μικροδιήθηση και απομεταλλώνεται (απιονίζεται) με ανταλλαγή ιόντων, ηλεκτροδιάλυση ή νανοδιήθηση. Οι πρωτεΐνες συγκεντρώνονται με διήθηση μεμβρανών ή χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής.<sup>[4][5]</sup> Κατά την ιοντοανταλλαγή, χρησιμοποιείται ιοντική στήλη, όπου εκλύονται τα μη πρωτεϊνικά συστατικά και προσροφούνται τα πρωτεϊνικά μόρια.<sup>[5]</sup>

## 1.2 Πρωτεΐνες γάλακτος

Οι πρωτεΐνες γάλακτος είναι πολύτιμα συστατικά με υψηλή θρεπτική αξία και με μία σειρά από φυσικές λειτουργικές ιδιότητες που τις καθιστούν περιζήτητα συστατικά για τα τρόφιμα. Η φυσική λειτουργία των πρωτεϊνών γάλακτος είναι να προμηθεύουν τα νεαρά θηλαστικά με τα απαραίτητα αμινοξέα που απαιτούνται για την ανάπτυξη των μυϊκών και άλλων ιστών που περιέχουν πρωτεΐνες, και με έναν αριθμό βιολογικά ενεργών πρωτεϊνών, π.χ. ανοσοσφαιρίνες, πρωτεΐνες που δεσμεύουν βιταμίνες και μέταλλα και διάφορες πρωτεϊνικές ορμόνες.<sup>[9]</sup>

Οι πρωτεΐνες του γάλακτος αφορούν περίπου το 3-4% της σύστασης του και αποτελούνται από καζεΐνη και πρωτεΐνες ορού γάλακτος. Προκειμένου να διαχωριστούν, το αρχικό αποβουτυρωμένο γάλα πήζει με τη βοήθεια οξέος και στο τυρί παραμένει η καζεΐνη.<sup>[3]</sup> Συγκεκριμένα, κατά την οξίνιση του γάλακτος σε pH 4.6 (το ισοηλεκτρικό pH) σε περίπου 30°C, περίπου το 80 % της συνολικής πρωτεΐνης στο βόειο γάλα καθιζάνει εκτός διαλύματος. Αυτό το κλάσμα ονομάζεται πλέον ισοηλεκτρική (όξινη) καζεΐνη. Οι πρωτεΐνες που παραμένουν διαλυτές υπό αυτές τις συνθήκες αναφέρονται ως πρωτεΐνες ορού γάλακτος.<sup>[9]</sup>

Τόσο οι καζεΐνες όσο και οι πρωτεΐνες ορού γάλακτος είναι ετερογενείς, με κάθε ομάδα να περιέχει πολλές διαφορετικές πρωτεΐνες.<sup>[9]</sup> Συνολικά, τα κλάσματα των πρωτεϊνών του γάλακτος φαίνεται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3).

Πίνακας 3: Κύριες πρωτεΐνες γάλακτος<sup>[3]</sup>

Πρωτεΐνη	g/kg γάλακτος	g/100g πρωτεΐνης
<b>καζεΐνη</b>	<b>28.8</b>	<b>80</b>
a <sub>s1</sub> - καζεΐνη	12.2	34
a <sub>s2</sub> - καζεΐνη	2.9	8
κ- καζεΐνη	3.2	9
β- καζεΐνη	9.0	25
γ- καζεΐνη	1.4	4
<b>πρωτεΐνη ορού γάλακτος</b>	<b>7.2</b>	<b>20</b>
β-λακτοσφαιρίνη	3.2	9
α-λακταλβουμίνη	1.4	4
αλβουμίνη ορού	0.4	1
ανοσοσφαιρίνες	0.8	2
πεπτόνη πρωτεάσης	1.4	4

Κύρια διαφορά των καζεϊνών και των πρωτεϊνών ορού γάλακτος είναι ότι οι δεύτερες είναι μοριακά διασκορπισμένες σε διάλυμα ή έχουν απλές τεταρτοταγείς δομές, ενώ οι καζεΐνες έχουν πολύπλοκη τεταρτοταγή δομή και υπάρχουν στο γάλα ως μεγάλα κολλοειδή συσσωματώματα, που αναφέρονται ως μικκύλια, όπως θα εξηγηθεί παρακάτω.<sup>[9]</sup>

Το γάλα περιέχει πολυάριθμες δευτερεύουσες πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένων περίπου 60 ενζύμων, μερικά από τα οποία, π.χ. λιποπρωτεϊνική λιπάση, πρωτεϊνάση, φωσφατάσες, λακτοϋπεροξειδάση και οξειδοαναγωγή ξανθίνης, είναι αρκετά σημαντικά. Οι περισσότερες από τις δευτερεύουσες πρωτεΐνες έχουν βιολογικές λειτουργίες και πιθανώς να παίζουν πολύ σημαντικούς ρόλους.<sup>[9]</sup>

### 1.2.1 Καζεΐνη

Η καζεΐνη αποτελεί το 80% των συνολικών πρωτεϊνών του γάλακτος και τα κλάσματα της είναι: η a<sub>s1</sub>- καζεΐνη 34%, η a<sub>s2</sub>- καζεΐνη 8%, η κ- καζεΐνη 9%, η β- καζεΐνη 25% και η γ- καζεΐνη 4%. Η κλασματοποίηση πραγματοποιείται με ηλεκτροφόρηση. Οι καζεΐνες δεν μετουσιώνονται λόγω της έλλειψης τριτοταγούς δομής.<sup>[3][9]</sup> Η καζεΐνη ορίζεται ως η πρωτεΐνη που καταβυθίζεται και είναι αδιάλυτη σε pH=4.6, μία ιδιότητα που χρησιμοποιείται για την παραγωγή γιαουρτιού και τυριού.

Πίνακας 4: Χαρακτηριστικά των καζεϊνών <sup>[3]</sup>

Υπομονάδα καζεΐνης	Αριθμός αμινοξέων	Ισοηλεκτρικό σημείο	Μοριακό βάρος (kda)
a <sub>s1</sub> - καζεΐνη	199	4.92-5.35	23.6
a <sub>s2</sub> - καζεΐνη	207	-	25.2
κ- καζεΐνη	169	5.77-6.07	18-19
β- καζεΐνη	209	5.20-5.85	24
γ- καζεΐνη	-	5.80-6.00	12-21

Η πήξη και ο διαχωρισμός της καζεΐνης από το γάλα είναι δυνατοί με την οξίνιση του γάλακτος με ζύμωση γαλακτικού οξέος ή με προσθήκη οξέων όπως HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, γαλακτικό οξύ ή H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Ένας άλλος τρόπος να επιτευχθεί η πήξη είναι η προσθήκη ενζύμων πρωτεάσης, όπως η χυμοσίνη και η πεψίνη. Η όξινη πήξη επιτυγχάνεται στους 35-50°C και σε pH 4.2-4.6 (εντός των ορίων του ισοηλεκτρικού σημείου της καζεΐνης). Η καζεΐνη



καθιζάνει ως χονδροειδείς κόκκοι και μπορεί να διαχωριστεί με φυγοκέντρηση. Η ενζυμική πήξη περιλαμβάνει θέρμανση στους 65°C μετά την καθίζηση στον ορό γάλακτος. [3]

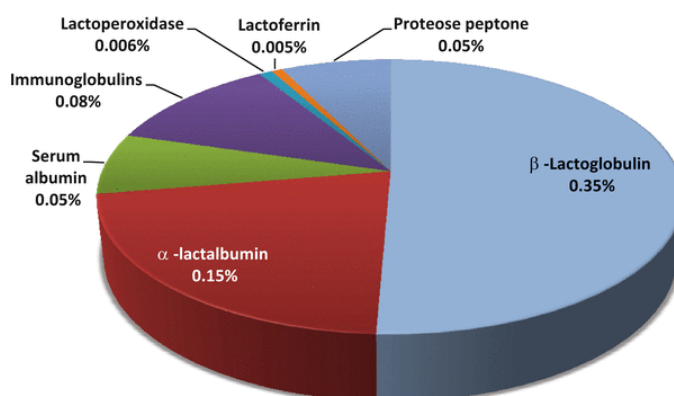
Οι α- και οι κ-καζεΐνες, οι οποίες αντιπροσωπεύουν περίπου το 85% της ολικής καζεΐνης, καθιζάνουν με ασβέστιο σε συγκεντρώσεις πάνω από 6 mM σε θερμοκρασίες άνω των 20°C. Επειδή το γάλα περιέχει περίπου 30 mmol/L Ca, θα ήταν αναμενόμενο οι περισσότερες καζεΐνες να καθιζάνουν στο γάλα. Ωστόσο, η κ-καζεΐνη είναι διαλυτή σε υψηλές συγκεντρώσεις ασβεστίου και αντιδρά με αυτό, και σταθεροποιεί τις ευαίσθητες στο ασβέστιο καζεΐνες μέσω σχηματισμού των μικκυλίων καζεΐνης. Τα μικκύλια είναι σφαιρικά κολλοειδή σωματίδια, με μέση διάμετρο <120 nm (εύρος 50-600 nm). Έχουν μέση μάζα σωματιδίων περίπου 108 Da, δηλαδή υπάρχουν περίπου 5000 μόρια καζεΐνης (20-25 kDa) σε ένα μέσο μικκύλιο. Αρκετοί παράγοντες μπορούν να προκαλέσουν μετουσίωση των σφαιρικών πρωτεϊνών (μικκύλια), όπως η υψηλή θερμοκρασία (>70°C), η χαμηλή θερμοκρασία (<20°C), η υψηλή πίεση (>100 MPa) και το υψηλό pH (>8). [3]

## 1.2.2 Πρωτεΐνες ορού γάλακτος

Οι πρωτεΐνες ορού γάλακτος έχουν υψηλή θρεπτική αξία, λόγω της υψηλής περιεκτικότητας σε απαραίτητα αμινοξέα, ιδιαίτερα σε αυτά που περιέχουν θείο. Εκτός από τις θρεπτικές ιδιότητες, οι πρωτεΐνες ορού γάλακτος έχουν λειτουργικές ιδιότητες που προσδίδουν ευεργετικές φυσικές ιδιότητες όταν χρησιμοποιούνται ως συστατικά στα τρόφιμα, κυρίως λόγω της υψηλής διαλυτότητας, απορρόφησης νερού, ζελατινοποίησης και γαλακτωματοποίησης. Λόγω της ειδικότητας του προϊόντος και της εξαιρετικής λειτουργικής και θρεπτικής αξίας, η εμπορική αξία του συμπυκνώματος πρωτεΐνης ορού γάλακτος είναι από 3 έως 40 φορές μεγαλύτερη από αυτή της σκόνης ορού γάλακτος. [8]

Έχουν αναπτυχθεί πολλές τεχνικές για την εκλεκτική συμπύκνωση των πρωτεϊνών ορού γάλακτος καθώς ο ορός έχει υψηλότερη περιεκτικότητα σε λακτόζη σε σύγκριση με την πρωτεΐνη χωρίς το ποσοστό αυτό να είναι ισορροπημένο. Η συμβατική μέθοδος συμπύκνωσης του ορού γάλακτος είναι η θερμική εξάτμιση. [8]

Όπως αναφέρθηκε, οι πρωτεΐνες ορού γάλακτος αποτελούν περίπου το 0.6-0.7% του υγρού ορού γάλακτος και το 10-13% της ξηρής μάζας του ορού. Η τυπική σύσταση των πρωτεϊνών του υγρού ορού φαίνεται στο Σχήμα 2. [4]



Σχήμα 2: Τυπική πρωτεϊνική σύσταση (%w/v) του υγρού ορού γάλακτος [4]

Στο γάλα, οι πρωτεΐνες ορού γάλακτος αφορούν αποτελούν περίπου το 20% των πρωτεϊνών του και αποτελούνται από: την β-λακτοσφαιρίνη 9%, την α-λακταλβουμίνη 4%, την αλβουμίνη ορού 1%, τις ανοσοσφαιρίνες 2% και πεπτόνη πρωτεάσης 4%. [3]

Πίνακας 5: Χαρακτηριστικά των πρωτεϊνών ορού γάλακτος <sup>[3]</sup>

πρωτεΐνη ορού γάλακτος	Ισοηλεκτρικό σημείο	Μοριακό βάρος (kdal)
β-λακτοσφαιρίνη	5.35-5.41	18.3
α-λακταλβουμίνη	4.2-4.5	14.2
αλβουμίνη ορού	5.13	66.3
ανοσοσφαιρίνες	5.5-8.3	152-950
πεπτόνη πρωτεάσης	3.3-3.7	4-41

Η β-λακτοσφαιρίνη αποτελεί περίπου το ήμισυ των συνολικών πρωτεϊνών του βόειου ορού γάλακτος ενώ απουσιάζει στο ανθρώπινο γάλα. Στη δομή της β-λακτοσφαιρίνης υπάρχει μια πρωτεΐνη που δεσμεύει την ρετινόλη και έχει την ικανότητα να ρυθμίζει τις λεμφικές αποκρίσεις. Επιπλέον, συνδέεται με υδρόφοβους προσδέτες όπως τα λιπαρά οξέα.<sup>[1]</sup>

Η α-λακταλβουμίνη αναφέρεται ότι είναι η δεύτερη πιο σημαντική πρωτεΐνη στον ορό γάλακτος ποσοτικά και αντιπροσωπεύει περίπου το 20% (w/w) της συνολικής πρωτεΐνης ορού γάλακτος. Συντίθεται πλήρως στον μαστικό αδέν. Σκοτώνει επίσης τα καρκινικά κύτταρα και έχει βακτηριοκτόνα αποτελέσματα στα ανώτερα αναπνευστικά συστήματα και προστατευτική δράση στον γαστρικό βλεννογόνο. Η άλφα-λακταλβουμίνη παίζει ζωτικό ρόλο στη μείωση του κινδύνου ορισμένων μορφών καρκίνου καθώς περιορίζει την κυτταρική διαίρεση.<sup>[1]</sup>

Η αλβουμίνη ορού βοοειδών (BSA) δεν παράγεται στον μαστικό αδέν, αλλά εκκρίνεται στο γάλα μετά από παθητική διαρροή από την κυκλοφορία του αίματος. Η πιο σημαντική ιδιότητα της αλβουμίνης βόειου ορού είναι η ικανότητά της να δεσμεύεται σε διάφορους υποκαταστάτες αναστρέψιμα. Είναι ο κύριος φορέας λιπαρών οξέων και μπορεί να συνδεθεί με ελεύθερα λιπαρά οξέα και άλλα λιπίδια καθώς και με αρωματικές ενώσεις. Ωστόσο, αυτή η ιδιότητα αλλοιώνεται κατά τη μετουσίωση με θέρμανση.<sup>[1]</sup>

Οι ανοσοσφαιρίνες (IgA, IgG, IgM) είναι αντισώματα και χημικώς γ-σφαιρίνες. Το κλάσμα ορού γάλακτος περιέχει μεγάλη ποσότητα ανοσοσφαιρινών που αποτελούν περίπου το 10-15% των συνολικών πρωτεϊνών ορού γάλακτος. Οι ανοσοσφαιρίνες έχουν θεραπευτικές ιδιότητες και βιολογικό ρόλο που σχετίζεται με θεραπεία γαστρεντερικών λοιμώξεων.<sup>[1]</sup>

Οι πεπτόνες πρωτεάσης είναι ένα πολύ σύνθετο μείγμα πεπτιδίων <sup>[9]</sup> που μένουν στο διάλυμα μετά την θέρμανση του γάλακτος σε υψηλή θερμοκρασία και την όξυνση του μέχρι pH 4.7. Μπορούν να βρεθούν μόνο σε ορό γάλακτος εξαιρουμένης της ανθρώπινης προέλευσης. Παράγεται κατά τη ζύμωση βοείου γάλακτος χωρίς λιπαρά και ενισχύει την παραγωγή μονοκλωνικών αντισωμάτων από τα ανθρώπινα κύτταρα.<sup>[1]</sup>

Η λακτοφερρίνη είναι μια γλυκοπρωτεΐνη που δεσμεύει τον σίδηρο που υπάρχει στο κλάσμα ορού γάλακτος του γάλακτος και του πρωτογάλακτος. Είναι ένα μη ενζυματικό αντιοξειδωτικό και αποτελείται από περίπου 689 υπολείμματα αμινοξέων. Η λακτοφερρίνη είναι επίσης γνωστό ότι είναι ένα σημαντικό αμυντικό μόριο του ξενιστή και εκτελεί μια σειρά από φυσιολογικές λειτουργίες όπως αντιμικροβιακή, αντιική, ανοσοτροποποιητική και αντιοξειδωτική δράση.<sup>[1]</sup>

Οι πρωτεΐνες ορού γάλακτος είναι διαλυτές σε pH 4.6 σε αντίθεση με την καζεΐνη. Επιπλέον, η καζεΐνη είναι σταθερή σε υψηλές θερμοκρασίες ενώ οι πρωτεΐνες ορού γάλακτος μετουσιώνονται σε θερμοκρασία πάνω από 70°C. <sup>[5]</sup>

### 1.3 Βιοπολυμερή

Τα βιοπολυμερή είναι πολυμερικά βιομόρια που παράγονται από ζωντανούς οργανισμούς. Τα περισσότερα είναι υλικά που σχηματίζονται στη φύση κατά τη διάρκεια του κύκλου ζωής των πράσινων φυτών, ζώων, βακτηρίων και μυκήτων είναι πολυμερή ή συνθετικά υλικά πολυμερικής μήτρας. Για παράδειγμα, όλες οι πρωτεΐνες είναι ειδικά συμπολυμερή με κανονικές διατάξεις διαφορετικών τύπων α-αμινοξέων. Αυτή η φυσική σύνθεση είναι μια εξαιρετικά πολύπλοκη διαδικασία που περιλαμβάνει πολλούς διαφορετικούς τύπους ενζύμων. <sup>[10]</sup>

Τα βιοπολυμερή περιλαμβάνουν τους πολυσακχαρίτες όπως η κυτταρίνη, το άμυλο, τα πολυμερή υδατανθράκων που παράγονται από βακτήρια και μύκητες και βιοπολυμερή με βάση ζωικές πρωτεΐνες όπως το μαλλί, το μετάξι, η ζελατίνη και το κολλαγόνο. <sup>[10]</sup>

Η πρώτη γενιά πολυμερών που έχουν σχεδιαστεί με στόχο να έχουν χαμηλό περιβαλλοντικό αντίκτυπο είναι τα βιοδιασπώμενα ή βιοαποικοδομήσιμα πολυμερή. Ωστόσο, αυτά τα υλικά δεν αντιμετωπίζουν τα θεμελιώδη προβλήματα της διάθεσης στο τέλος του κύκλου ζωής τους και της χρήσης μη ανανεώσιμων πρώτων υλών. <sup>[10]</sup> Αντιθέτως, οι κύριες πηγές των βιοπολυμερών είναι ανανεώσιμες και πολλά βιοπολυμερή είναι βιοδιασπώμενα, δηλαδή είναι ικανά να αποσυντεθούν σε διοξείδιο του άνθρακα, μεθάνιο, νερό, ανόργανες ενώσεις ή βιομάζα από την ενζυμική δράση μικροοργανισμών.

Τα βιοπολυμερή που λαμβάνονται από ανανεώσιμες πηγές ή αγροβιομηχανία, ζωικής προέλευσης και θαλάσσια απόβλητα και υποπροϊόντα γίνονται εναλλακτικές λύσεις που αναγνωρίζονται όλο και περισσότερο από μια πιο βιώσιμη κοινωνία. Η βιομηχανική παραγωγή τροφίμων παράγει μεγάλη ποσότητα απορριμμάτων που τις περισσότερες φορές απορρίπτονται στο περιβάλλον ως οργανικά απόβλητα ή χρησιμοποιούνται ως ζωοτροφές. <sup>[35]</sup> Μεταξύ των αποβλήτων και των παραπροϊόντων που παράγονται σε μεγαλύτερες ποσότητες είναι τα απόβλητα φρούτων και λαχανικών (φλοιοί, σπόροι και μίσχοι), τα απόβλητα δημητριακών (ρύζι, σιτάρι, σόγια) και ζωικά υποπροϊόντα [(χιτοζάνη, ζελατίνη, πρωτεΐνη ορού γάλακτος (WPI))]. Τα περισσότερα βιοαποικοδομήσιμα πολυμερή δημιουργούν φιλμ με κατώτερα χαρακτηριστικά από τα συνθετικά πλαστικά όσον αφορά τις μηχανικές ιδιότητες και τις ιδιότητες φραγμού. <sup>[35]</sup>

Προκειμένου τα πολυμερή που χρησιμοποιούνται στη συσκευασία να έχουν το μικρότερο δυνατό περιβαλλοντικό αντίκτυπο όπως περιγράφηκε, συνίσταται να υπάγονται στην κατηγορία των «πράσινων» πολυμερών. Αυτό προϋποθέτει τα πολυμερή να έχουν πράσινες ιδιότητες όπως βιοδιασπασιμότητα και βιολογική προέλευση και ταυτόχρονα να παράγονται από βιώσιμες διεργασίες. Όμως, όταν τα βιοδιασπώμενα πολυμερή αφήνονται στο περιβάλλον, ο ρυθμός αποικοδόμησής τους είναι πάρα πολύ αργός και απαιτούνται μεγάλα χρονικά διαστήματα για την θραυσματοποίησή τους σε ικανοποιητικό βαθμό.

### 1.3.1 Πρωτεϊνικά βιοπολυμερή

Μια μεγάλη κατηγορία βιοπολυμερών είναι τα πρωτεϊνικά βιοπολυμερή, δηλαδή πολυμερή με μονομερή πρωτεΐνες. Οι πρωτεΐνες, οι οποίες διατίθενται σε αφθονία από βιώσιμους πόρους φυτικής ή ζωικής προέλευσης, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πρώτες ύλες για τον σχηματισμό βρώσιμων μεμβρανών και επικαλύψεων.<sup>[12]</sup> Εφόσον, οι πρώτες ύλες είναι βρώσιμα υλικά, τα πολυμερή που θα προκύψουν στις παραπάνω μορφές θα είναι βρώσιμα.

#### 1.3.1.1 Μέθοδοι σχηματισμού πρωτεϊνικών φιλμ

##### 1. Σχηματισμός φιλμ με αφαίρεση από επιφάνεια (αποβουτύρωση) (by skimming)

Τα βρώσιμα φιλμ από πρωτεΐνες σόγιας παράγονται παραδοσιακά στην Ασία πάνω στην επιφάνεια γάλακτος σόγιας σε ανοιχτά θερμά σκεύη και έπειτα ξηραίνονται για να χρησιμοποιηθούν ως περιτυλίγματα κρεάτων και λαχανικών. Επιπλέον, φιλμ πρωτεϊνών-λιπιδίων έχουν παρασκευαστεί στην επιφάνεια των αντίστοιχων φυτικών ροφημάτων: γάλα φιστικιού, βαμβακόσπορου και φασολιού.<sup>[12]</sup>

##### 2. Σχηματισμός φιλμ με θερμική συμπίεση (by thermal compaction)

Μίγματα απομονωμένης πρωτεΐνης σόγιας και γλυκερόλης έχουν συμπυκνωθεί σε θερμοκρασία 150-160°C και πίεση 10MPa. Η χύτευση με συμπίεση των μεμβρανών πρωτεΐνης ορού γάλακτος έχει επίσης διερευνηθεί.<sup>[12]</sup>

##### 3. Σχηματισμός φιλμ με εξώθηση (by extrusion)

Η θερμοπλαστική εξώθηση θα μπορούσε να είναι μια ελκυστική μέθοδος για μεγάλης κλίμακας εμπορική παραγωγή πρωτεϊνικών μεμβρανών επειδή εξαλείφει την ανάγκη για προσθήκη διαλύτη και εξάτμιση. Τα περιβλήματα κολλαγόνου παράγονται εμπορικά με εξώθηση παχύρρευστων, υδατικών εναιωρημάτων οξινισμένου κολλαγόνου. Ο σχηματισμός εξωθημένων μεμβρανών από άλλους τύπους πρωτεϊνών έχει επίσης αναφερθεί στην ευρεσιτεχνία και την επιστημονική βιβλιογραφία. Για παράδειγμα, έχει πραγματοποιηθεί η διαδικασία με χρήση πρωτεΐνης σόγιας σε υδατικό διάλυμα με πίεση από 5 έως 50 kg/cm<sup>2</sup> και θερμοκρασία 110 έως 180 °C στον εξωθητή για να λιώσουν την πρώτη ύλη. Επιπλέον, έχει αναπτυχθεί μια διαδικασία υγρής περιδίνησης για την παρασκευή μεμβρανών από όξινη καζεΐνη. Η διαδικασία περιελάμβανε εξώθηση ενός διαλύματος όξινης καζεΐνης σε ένα λουτρό πήξης που περιέχει υδροξείδιο του νατρίου, ακολουθούμενη από σκλήρυνση, έκπλυση και ξήρανση. Οι σκληρές χημικές ουσίες που χρησιμοποιούνται στα στάδια πήξης και σκλήρυνσης πιθανότατα θα καθιστούσαν τέτοιες μεμβράνες μη βρώσιμες.<sup>[12]</sup>

##### 4. Σχηματισμός φιλμ με χύτευση με διαλύτη (by solvent casting)

Τα πρωτεϊνικά φιλμ κατά κύριο λόγο σχηματίζονται με χύτευση και ξήρανση αραιωμένων διαλυμάτων πρωτεΐνης (συνήθως 5±10% w/v) σε νερό ή σε υδατική αιθανόλη, ανάλογα με την πρωτεΐνη. Για παράδειγμα, οι μεμβράνες από απομονωμένη πρωτεΐνη σόγιας, πρωτεΐνη ορού γάλακτος, μουσινδική πρωτεΐνη ψαριού και πρωτεΐνη λευκού αυγού συνήθως χυτεύονται από υδατικά διαλύματα. Άλλες πρωτεΐνες που έχουν υψηλότερη περιεκτικότητα σε μη πολικά αμινοξέα, όπως η ζεΐνη και η γλουτένη σίτου, συνήθως χυτεύονται από διαλύματα σε υδατική αιθανόλη. Έχει επίσης αναφερθεί η χρήση άλλων οργανικών διαλυτών, όπως η ακετόνη, η μεθανόλη και η ισοπροπυλική αλκοόλη, για την

παρασκευή διαλυμάτων με βάση την πρωτεΐνη που σχηματίζουν φιλμ. Όμως, η χρήση τέτοιων διαλυτών θα καθιστούσε τις μεμβράνες μη βρώσιμες.<sup>[12]</sup>

Η ανάπτυξη των δομών της μεμβράνης κατά την ξήρανση των πρωτεϊνικών διαλυμάτων περιλαμβάνει σχηματισμό υδρόφοβων, υδρογόνου και ιοντικών δεσμών. Το pH των διαλυμάτων που σχηματίζουν φιλμ πρωτεΐνης συνήθως ρυθμίζεται μακριά από το ισοηλεκτρικό σημείο της πρωτεΐνης για να αποφευχθεί η καθίζησή της.<sup>[12]</sup>

### 1.3.1.2 Βρώσιμα πρωτεϊνικά φιλμ

Τα βρώσιμα φιλμ και μεμβράνες θεωρείται ότι εμποδίζουν την ανεπιθύμητη μεταφορά υγρασίας, αερίων, αρωμάτων ή άλλων μικρών μορίων. Οι εδωδιμες επικαλυπτικές μεμβράνες μπορούν να αυξήσουν την διατηρησιμότητα των τροφίμων και χαρακτηρίζονται από ευρεία διαθεσιμότητα και βιοσυμβατότητα.

Μεταξύ των βιοπολυμερών, οι πρωτεΐνες διαθέτουν εξαιρετικές ιδιότητες σχηματισμού φιλμ που τις καθιστούν χρήσιμες στην ανάπτυξη βρώσιμων μεμβρανών σε εμπορική κλίμακα.<sup>[11]</sup> Η ικανότητα σχηματισμού μεμβρανών εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τα μοριακά τους χαρακτηριστικά, όπως το μοριακό βάρος, η διαμόρφωση, το φορτίο, η ευκαμψία και η θερμική σταθερότητα.<sup>[14]</sup> Τα βρώσιμα πρωτεϊνικά φιλμ είναι γενικά άοσμα, άγευστα, εύκαμπτα και ποικίλλουν σε ημιδιαφανή έως διαφανή, ανάλογα με την πηγή της πρωτεΐνης, την διαμόρφωση και την σύσταση.<sup>[5]</sup>

Ο βαθμός επιμήκυνσης, η φύση των αλληλουχιών αμινοξέων και η κατανομή και το άθροισμα των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πρωτεϊνικών αλυσίδων σχετίζονται στενά με τις μηχανικές ιδιότητες των φιλμ.<sup>[14]</sup> Η υδατοδιαλυτότητα των μεμβρανών μπορεί να μειωθεί με επεξεργασία των μεμβρανών με ρυθμιστικά διαλύματα στο ισοηλεκτρικό σημείο των πρωτεϊνών. Η ενσωμάτωση λιπιδίων μειώνει σημαντικά τη διαπερατότητα υδρατμών των μεμβρανών ενώ η προσθήκη πλαστικοποιητών για την αύξηση της ευκαμψίας του φιλμ τείνει να αυξάνει τη διαπερατότητα υδρατμών.<sup>[5]</sup>

Οι πρωτεΐνες που είναι υποπροϊόντα ή παραπροϊόντα της επεξεργασίας τροφίμων έχουν προσελκύσει σημαντικό ενδιαφέρον ως υλικά σχηματισμού φιλμ.<sup>[12]</sup> Τα κύρια υλικά που έχουν χρησιμοποιηθεί ως πρώτη ύλη για τη δημιουργία φιλμ και μεμβρανών είναι η πρωτεΐνη καλαμποκιού (corn zein), η γλουτένη σίτου (wheat gluten), η απομονωμένη πρωτεΐνη σόγιας (soy protein isolate), το αλεύρι βαμβακόσπορου (cottonseed flour), τα συμπυκνώματα και οι απομονωμένες πρωτεΐνες ορού γάλακτος (WPC, WPI), η καζεΐνη (casein), η αλβουμίνη (egg albumen), το κολλαγόνο/ζελατίνη (collagen/gelatin) και η μυοϊνιδική πρωτεΐνη ψαριού (fish myofibrillar protein).<sup>[12]</sup>

Η καζεΐνη μπορεί εύκολα να σχηματίσει μεμβράνες από υδατικά διαλύματα χωρίς περαιτέρω επεξεργασία λόγω της ισχυρής συνοχής μεταξύ των αλυσίδων που προκαλείται από τη φύση της τυχαίας σπείρας και του μεγάλου αριθμού σχηματισμένων διαμοριακών δεσμών υδρογόνου, υδρόφοβων και ηλεκτροστατικών δεσμών. Κάποιες ιδιότητες της καζεΐνης, όπως βιοδιασπασιμότητα, υψηλή θερμική σταθερότητα, μη τοξικότητα, ικανότητα δέσμευσης μικρών μορίων και ιόντων, ικανότητα σχηματισμού μικκυλίων, καθιστούν την πρωτεΐνη καλό υλικό για βιοαποδομήσιμα φιλμ. Λόγω της υδατοδιαλυτότητας, της ικανότητας γαλακτωματοποίησης και της υψηλής θρεπτικής τους αξίας, οι καζεΐνες είναι επιθυμητά βιοϋλικά για την παρασκευή βρώσιμων μεμβρανών.<sup>[15]</sup>

Μεμβράνες με βάση τις πρωτεΐνες ορού γάλακτος μπορούν να ληφθούν από συμπυκνώματα πρωτεΐνης ορού γάλακτος (WPC) και απομονωμένες πρωτεΐνες ορού γάλακτος (WPI). Ο σχηματισμός φιλμ των μεμβρανών με βάση τον ορό γάλακτος εξαρτάται από τη θερμική μετουσίωση των πρωτεϊνών ορού γάλακτος σε υδατικά διαλύματα.<sup>[15]</sup> Η πρωτεΐνη ορού γάλακτος είναι υδατοδιαλυτή, αλλά η β-λακτοσφαιρίνη μετουσιώνεται όταν θερμαίνεται, εκθέτοντας εσωτερικές θειούχες ομάδες της κυστεΐνης, οι οποίες στη συνέχεια διασυνδέονται για να σχηματίσουν ένα αδιάλυτο φιλμ.<sup>[34]</sup>

Τα καζεϊνικά βρώσιμα φιλμ έχουν μειωμένη διαπερατότητα υδρατμών ενώ τα φιλμ από πρωτεΐνες ορού γάλακτος παρουσιάζουν ικανοποιητική φραγή στη διέλευση αερίων λόγω της εξαιρετικά πολικής φύσης των πρωτεϊνών. Οι μεμβράνες από πρωτεΐνες γάλακτος παρουσιάζουν καλή αντοχή σε εφελκυσμό και χαμηλή ελαστικότητα σε σύγκριση με άλλες πλαστικές μεμβράνες. Επιπλέον, τα συμπυκνώματα πρωτεϊνών ορού γάλακτος μπορούν να προσφέρουν βρώσιμες μεμβράνες με καλές λειτουργικές ιδιότητες.<sup>[5]</sup> Τόσο η καζεΐνη όσο και οι πρωτεΐνες ορού γάλακτος μπορούν να σχηματίσουν άοσμες, εύκαμπτες και διαφανείς μεμβράνες υψηλής θρεπτικής αξίας.<sup>[11][15]</sup>

Τα πρωτεϊνικά φιλμ σχηματίζονται με διαλυτοποίηση πρωτεϊνών σε νερό ή αραιωμένη αιθανόλη (συνήθως 5-10%w/v) ανάλογα με την πρωτεΐνη και ακολουθεί ξήρανση τους. Για παράδειγμα, φιλμ από απομονωμένη πρωτεΐνη σόγιας, πρωτεΐνη ορού γάλακτος, μυοϊνώδη πρωτεΐνη ψαριού και αλβουμίνη συνήθως δημιουργούνται από υδατικά διαλύματα.<sup>[12]</sup> Ο σχηματισμός φιλμ από πρωτεΐνες γάλακτος περιλαμβάνει την θέρμανση τους σε υδατικό διάλυμα στους 75-100°C, κατά την οποία παράγονται δισουλφιδικοί δεσμοί και λαμβάνει χώρα η μη αναστρέψιμη μετουσίωση των πρωτεϊνών ορού γάλακτος και οι σχηματιζόμενες μεμβράνες έχουν σταθερή δομή.<sup>[11][15][35]</sup>

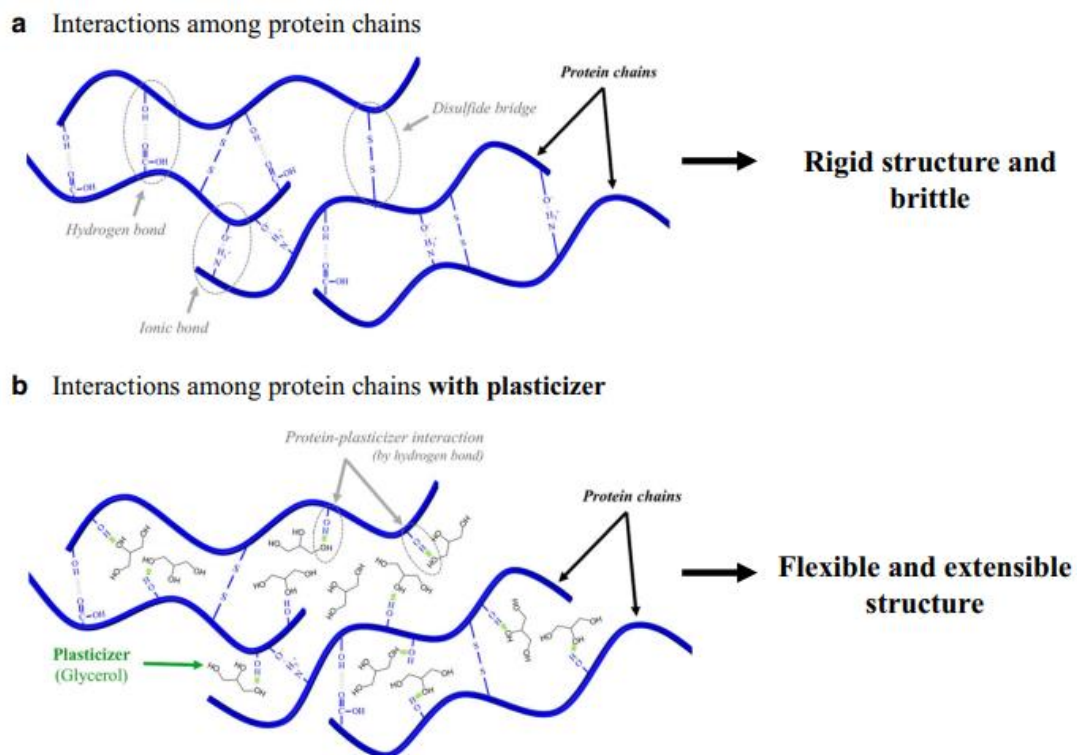
Εκτός από τους δισουλφιδικούς δεσμούς, πολλοί παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν τη δομή του φιλμ. Η κατανομή των φορτισμένων, πολικών και μη πολικών αμινοξέων κατά μήκος της πρωτεϊνικής αλυσίδας δημιουργεί χημικό δυναμικό και οι προκύπτουσες δυνάμεις αλληλεπίδρασης παράγουν μια συνεκτική πρωτεϊνική μήτρα του φιλμ.<sup>[11]</sup> Τη δομή της μεμβράνης επηρεάζουν οι υδρόφοβοι και οι ιοντικοί δεσμοί αλλά και οι δεσμοί υδρογόνου.<sup>[12][14]</sup> Επιπλέον, η θερμοκρασία ξήρανσης και η σχετική υγρασία (RH) μπορούν να καθορίσουν το ρυθμό ξήρανσης και κατ' επέκταση τις ιδιότητες και τη δομή των πρωτεϊνικών φιλμ. Γενικά, η ταχεία ξήρανση των πολυμερικών διαλυμάτων περιορίζει την ανάπτυξη διαμοριακών ενώσεων εντός της δομής του φιλμ καθώς η απομάκρυνση του διαλύτη περιορίζει την κινητικότητα των μοριακών αλυσίδων.<sup>[12]</sup>

Παρά την πρόοδο στην ανάπτυξη πρωτεϊνικών μεμβρανών ως υλικά συσκευασίας, οι φυσικές τους ιδιότητες παραμένουν κατώτερες από εκείνες των συνθετικών μεμβρανών, όπως το LDPE, το HDPE ή το σελοφάν, παρουσιάζοντας ασθενέστερη δομή και μικρότερη επιμήκυνση.<sup>[14]</sup> Όσον αφορά τις ιδιότητες φραγμού, οι πρωτεϊνικές μεμβράνες έχουν υψηλότερη διαπερατότητα υδρατμών σε σύγκριση με την πλειοψηφία των συνθετικών πολυμερών, λόγω της υδρόφιλης φύσης τους. Έτσι, έχουν μελετηθεί ορισμένες μέθοδοι για την ενίσχυση της δομής και της λειτουργικότητάς τους, όπως αυτές της πλαστικοποίησης, του cross-linking, της ανάπτυξης συνθετικών μεμβρανών με ανάμιξη με άλλα πολυμερή και της εφαρμογής της νανοτεχνολογίας με τον εγκλεισμό διαφορετικών νανοσωματιδίων.<sup>[14]</sup>

### 1.3.2 Πλαστικοποιητές

Τα πρωτεϊνικά φιλμ και επικαλύψεις (coatings) θα πρέπει να έχουν καλή αντοχή και ελαστικότητα προκειμένου να αποφευχθούν οι ρωγμές κατά τον χειρισμό και την αποθήκευσή τους.<sup>[12]</sup> Το άθροισμα των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πρωτεϊνικών αλυσίδων οδηγεί σε μια άκαμπτη και εύθραυστη δομή.<sup>[14]</sup> Ως εκ τούτου, επιπλέον συστατικά στις μεμβράνες μπορούν να προσδώσουν σταθερότητα, ιδιότητες διαπερατότητας, ευελιξία και ομοιογένεια. Πλαστικοποιητές σχετικά χαμηλού μοριακού βάρους προστίθενται συχνά σε παρασκευάσματα που σχηματίζουν φιλμ πρωτεΐνης για να αυξήσουν την ευκαμψία και την εκτασιμότητα της δομής των σχηματισμένων φιλμ.<sup>[12]</sup> <sup>[14]</sup> Η δράση των πλαστικοποιητών στην πρωτεϊνική αλυσίδα φαίνεται στο Σχήμα 3 <sup>[14]</sup>.

Γενικά, οι πλαστικοποιητές δρουν εισχωρώντας μεταξύ πολυμερικών μοριακών αλυσίδων που συνδέονται φυσικοχημικά με το πολυμερές, μειώνοντας τη συνεκτικότητα εντός του δικτύου του φιλμ και επεκτείνοντας και μαλακώνοντας αποτελεσματικά τη δομή του φιλμ.<sup>[12]</sup> Οι πλαστικοποιητές συνήθως μειώνουν την αντοχή σε εφελκυσμό και αυξάνουν την επιμήκυνση του φιλμ.<sup>[14]</sup> Δυστυχώς, οι πλαστικοποιητές συχνά μειώνουν την ικανότητα των μεμβρανών να δρουν ως φραγμοί στη μεταφορά υγρασίας, αερίων και αρωματικών ενώσεων.<sup>[12]</sup>



Σχήμα 3: Σχηματική αναπαράσταση της δράσης του πλαστικοποιητή στη δομή του πρωτεϊνικού δικτύου. *a.* Το σύνολο των αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεϊνικών αλυσίδων (ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, δεσμοί υδρογόνου και δισουλφιδικοί δεσμοί) που δημιουργούν μια άκαμπτη και εύθραυστη δομή φιλμ και *b.* Η διάταξη και η αλληλεπίδραση του πλαστικοποιητή με τις πρωτεϊνικές αλυσίδες που οδηγούν σε μια εύκαμπτη και εκτατή δομή φιλμ. <sup>[14]</sup>

Η ποσότητα του πλαστικοποιητή που προστίθεται σε παρασκευάσματα που σχηματίζουν φιλμ πρωτεΐνης ποικίλλει ευρέως εντός της περιοχής από 10% έως 60% κατά βάρος της πρωτεΐνης. Οι πολυόλες γλυκερόλη και σορβιτόλη είναι οι πιο συχνά

χρησιμοποιούμενοι πλαστικοποιητές για μεμβράνες με βάση τις πρωτεΐνες.<sup>[12][14]</sup> Άλλα υδρόφιλα μόρια που έχουν χρησιμοποιηθεί ως πλαστικοποιητές περιλαμβάνουν αιθυλενογλυκόλη, διαιθυλενογλυκόλη, τριαιθυλενογλυκόλη, πολυαιθυλενογλυκόλη, προπυλενογλυκόλη, ουρία, γλυκόζη, ξυλιτόλη, μανιτόλη, σακχαρόζη και σουκρόζη.<sup>[12][14][15]</sup> Επίσης, λιπαρά οξέα, όπως ελαϊκό, παλμιτικό, στεατικό και λινολεϊκό οξύ, έχουν χρησιμοποιηθεί για την πλαστικοποίηση των μεμβρανών από πρωτεΐνη καλαμποκιού.<sup>[12]</sup>

Συνήθως, οι πλαστικοποιητές με μικρότερο μοριακό βάρος είναι πιο αποτελεσματικοί και οι πλαστικοποιητές με χαμηλή πολικότητα είναι λιγότερο αποτελεσματικοί σε σύγκριση με τους πλαστικοποιητές υψηλής πολικότητας. Επιπλέον, ορισμένοι πλαστικοποιητές θα μπορούσαν να μεταναστεύσουν έξω από τη μήτρα του φιλμ λόγω έλλειψης συμβατότητας με την πρωτεΐνη, όπως στην περίπτωση της πολυαιθυλενογλυκόλης, της πολυπροπυλενογλυκόλης και της τετρααιθυλενογλυκόλης. Αυτή η έλλειψη συμβατότητας οφείλεται πιθανώς στη χημική φύση, το μέγεθος και τη δομή τόσο του πολυμερούς όσο και του πλαστικοποιητικού παράγοντα, που απαιτούν μελέτες συμβατότητας που αποδεικνύουν μια επαρκή συνέργεια για τη βελτίωση των δομικών ιδιοτήτων του φιλμ.<sup>[14]</sup>

Παράλληλα, το ίδιο το νερό μειώνει τη θερμοκρασία μετάπτωσης γυαλιού των πρωτεϊνικών μεμβρανών, λειτουργώντας ως αποτελεσματικός πλαστικοποιητής.<sup>[12][14]</sup> Έτσι, η περιεκτικότητα σε υγρασία του φιλμ, που επηρεάζεται από τη σχετική υγρασία (RH) του περιβάλλοντος περιβάλλοντος, επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό τις ιδιότητες του πρωτεϊνικού φιλμ.<sup>[12]</sup>

Αν και υπάρχουν τόσοι πολλοί τύποι πλαστικοποιητών, οι πιο κατάλληλοι και συνήθως χρησιμοποιούμενοι πλαστικοποιητές για διαφορετικές μεμβράνες με βάση πρωτεΐνη δεν είναι οι ίδιοι, και ο πλαστικοποιητής που επιλέγεται για τις ίδιες μεμβράνες πρωτεΐνης είναι επίσης διαφορετικός σε διαφορετικές εφαρμογές. Έτσι, για φιλμ με βάση τις πρωτεΐνες ορού γάλακτος συνήθως χρησιμοποιείται γλυκερόλη και σορβιτόλη ενώ για φιλμ με βάση την καζεΐνη έχει χρησιμοποιηθεί σορβιτόλη, γλυκερόλη και νερό.<sup>[15]</sup>

### 1.3.3 Εφαρμογές στην συσκευασία τροφίμων

Η συσκευασία είναι η τεχνική κατά την οποία χρησιμοποιούνται κατάλληλοι περιέκτες και υλικά προκειμένου να προστατεύσουν και να διατηρήσουν το τρόφιμο από την παραγωγή μέχρι την κατανάλωσή του. Για την επίτευξη αυτών των στόχων, τα συνθετικά πολυμερή προτιμώνται ως επί το πλείστον λόγω της ανώτερης αντοχής σε εφελκυσμό, της τάσης εφελκυσμού και της χαμηλής διαπερατότητας σε υδρατμούς.<sup>[11]</sup> Η επιλογή των υλικών συσκευασίας τροφίμων εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά των συσκευασμένων τροφίμων. Επιπλέον, η επιλογή των υλικών συσκευασίας τροφίμων πρέπει να λαμβάνει υπόψη περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως η σχετική υγρασία, η θερμοκρασία και η ένταση φωτός, στα οποία εκτίθενται τα τρόφιμα κατά τη διανομή και την αποθήκευση.<sup>[15]</sup>

Η βιομηχανία πλαστικών πετρελαϊκής προέλευσης αποτελεί σημαντική περιβαλλοντική επιβάρυνση λόγω της μεγάλης ποσότητας συσκευασιών που παράγονται και συχνά δεν επαναχρησιμοποιούνται ή απορρίπτονται ακατάλληλα.<sup>[35]</sup> Οι απαιτήσεις των καταναλωτών στρέφονται προς συσκευασίες φιλικές προς το περιβάλλον και λιγότερο ρυπογόνες γι' αυτό και εξετάζεται από τους ερευνητές το ενδεχόμενο αντικατάστασης των υλικών συσκευασίας με νέα που προέρχονται από φυσικές ή ανανεώσιμες πηγές.<sup>[13]</sup> Προκειμένου να μειωθούν τα τοξικά απόβλητα, υπάρχει μεγάλη ανάγκη να αναπτυχθούν βιοαποδομήσιμα



υλικά συσκευασίας από φθηνές και άμεσα διαθέσιμες πρώτες ύλες.<sup>[11] [15]</sup> Τέτοια, είναι τα βρώσιμα βιοπολυμερή που περιγράφηκαν.<sup>[35]</sup>

Προκειμένου να βελτιωθεί η ποιότητα των τροφίμων και να παραταθεί η διάρκεια ζωής τους, μια νέα γενιά ενεργών βρώσιμων μεμβρανών σχεδιάζεται ειδικά μετά την ενσωμάτωση οργανικών οξέων, ενζύμων, αντιμικροβιακών πρωτεϊνών, φαινολικών ενώσεων ή άλλων λειτουργικών συστατικών όπως προβιοτικά, γεύσεις, βιταμίνες και θρεπτικά συστατικά. Αυτές οι δραστικές ενώσεις έχουν διαφορετικούς μηχανισμούς δράσης που σχετίζονται με τη δομή τους, τη συγκέντρωσή τους, τη φύση του στοχευόμενου μικροοργανισμού, τη διαδικασία ενθυλάκωσης ή ενσωμάτωσης στα δίκτυα फिल्म βιοπολυμερούς.<sup>[33]</sup> Η εφαρμογή των ενεργών μεμβρανών με άμεση ή έμμεση επαφή με τα τρόφιμα επηρεάζει επίσης τη βιοδραστικότητα αυτών των ενώσεων. Οι βρώσιμες μεμβράνες προσφέρουν δύο βασικά πλεονεκτήματα έναντι της άμεσης ενσωμάτωσης των αντιμικροβιακών ή αντιοξειδωτικών παραγόντων στα χύμα τρόφιμα: 1) στον έλεγχο της διάχυσης των δραστικών ουσιών στην επιφάνεια του τροφίμου και 2) στη μείωση της ποσότητας των συντηρητικών που προστίθενται στα τρόφιμα.<sup>[33][35]</sup>

Ένα βρώσιμο फिल्म ή επικάλυψη ορίζεται ως ένα λεπτό συνεχές στρώμα βρώσιμου υλικού που σχηματίζεται και/ή τοποθετείται πάνω ή ανάμεσα σε τρόφιμα ή συστατικά τροφίμων.<sup>[11]</sup> Τα τελευταία χρόνια, οι βιοαποικοδομήσιμες μεμβράνες που παρασκευάζονται με ζωικές και φυτικές πρωτεΐνες έχουν λάβει αυξανόμενη προσοχή και χρησιμοποιούνται όλο και περισσότερο στη βιομηχανία συσκευασίας τροφίμων λόγω της σχετικής αφθονίας, της ικανότητας σχηματισμού फिल्म, της βιοδιασπασιμότητας και της θρεπτικής τους αξίας.<sup>[14][15]</sup> Οι ιδανικές πρωτεϊνικές μεμβράνες για εφαρμογή στη συσκευασία τροφίμων πρέπει να είναι σκληρές, ελαστικές και πολύ χαμηλής διαπερατότητας.<sup>[14]</sup>

Οι βρώσιμες μεμβράνες ή επικαλύψεις βελτιώνουν την ποιότητα των τροφίμων περιορίζοντας τη μετακίνηση υγρασίας, λιπιδίων, γεύσης και χρώματος μεταξύ των συστατικών των τροφίμων.<sup>[11][15]</sup> Οι μεμβράνες που παρασκευάζονται με βάση τις πρωτεΐνες του γάλακτος εκτός από άοσμες, εύκαμπτες και διαφανείς, μπορούν να χρησιμεύσουν και ως φορείς πρόσθετων όπως αντιοξειδωτικά, αντιμικροβιακά μέσα και χρωστικές ουσίες, ενισχύοντας έτσι τις οργανοληπτικές ιδιότητες των συσκευασμένων προϊόντων τροφίμων.<sup>[11] [12][15]</sup> Οι εξαιρετικές ιδιότητες φραγμού αερίων και οι ικανοποιητικές μηχανικές ιδιότητες καθιστούν τα βιοπολυμερή με βάση τις πρωτεΐνες ένα από τα πιο πιθανά υλικά για τη συσκευασία τροφίμων. Ωστόσο, τα πρωτεϊνικά βιοπολυμερή έχουν μεγάλη διαπερατότητα υδρατμών και η προσθήκη κάποιων άλλων βιοϋλικών μπορεί να μειώσει την ευαισθησία στην υγρασία. Η ευαισθησία και η ευθραυστότητα που επιδεικνύονται κατά τον σχηματισμό κάνουν τα फिल्म με βάση την πρωτεΐνη να παρουσιάζουν κακές μηχανικές ιδιότητες όσον αφορά τη δυνατότητα επεξεργασίας και την τελική τους χρήση.<sup>[15]</sup>

Τα πρωτεϊνικά फिल्म και μεμβράνες έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως στη συντήρηση φρούτων και λαχανικών. Για να επεκταθεί η διάρκεια ζωής των φρούτων και των λαχανικών, πρέπει να μειωθεί ο ρυθμός αναπνοής και διαπνοής μέσω της ρύθμισης της σχετικής υγρασίας, της θερμοκρασίας, του φωτός, των περιβαλλόντων αερίων (οξυγόνο, διοξείδιο του άνθρακα, αιθυλένιο) κλπ. Κάποιοι από αυτούς τους παράγοντες μπορούν να ρυθμιστούν με την κατάλληλη συσκευασία τροφίμων, όπως η σχετική υγρασία και η συγκέντρωση O<sub>2</sub> και CO<sub>2</sub>. Συγκεκριμένα, έχει αποδειχθεί ότι फिल्म από πρωτεΐνη ζεΐνης σε ντομάτες καθυστερεί την υποβάθμιση του χρώματος, της υφής και την απώλεια βάρους της. Τα ίδια फिल्म σε μήλα μειώνουν τον ρυθμό αναπνοής τους ενώ ως επικάλυψη αχλαδιών αυξάνουν τον ρυθμό αναπνοής τους. Επιπλέον, μεμβράνες από ζελατίνη χρησιμοποιούνται συχνά για την

παράταση της διάρκειας ζωής ορισμένων ειδών λαχανικών και φρούτων, όπως καρότα, ντοματίνια, πιπεριές, μπανάνες, φράουλες, πεπόνια, ανανά, βατόμουρα και λωτούς. <sup>[15]</sup>

Τα πρωτεϊνικά φιλμ έχουν εφαρμοστεί σε διάφορα είδη τυριών προκειμένου να επεκτείνουν τη διάρκεια ζωής τους. Η επιλογή των κατάλληλων υλικών συσκευασίας για το τυρί είναι πρόκληση, επειδή υπάρχουν πολλές βιοχημικές και μικροβιακές διεργασίες που εμπλέκονται στην παραγωγή τυριού, όπως λιπόλυση, οξειδωση, πρωτεόλυση, απώλεια βάρους και περιεκτικότητα σε υγρασία, που επηρεάζουν τη γεύση, την υφή και όλες τις άλλες φυσικές και χημικές ιδιότητες. Οι ιδιότητες φραγμού των υλικών συσκευασίας έχουν μεγάλο αντίκτυπο στη διάρκεια ζωής του τυριού. Η συσκευασία του τυριού απαιτεί ανταλλαγή αερίων, επειδή το τυρί καταναλώνει οξυγόνο και απελευθερώνει CO<sub>2</sub>, αλλά τα υλικά συσκευασίας πρέπει να έχουν χαμηλή διαπερατότητα οξυγόνου για να αποτρέψουν την ανάπτυξη επιβλαβών μικροοργανισμών και την οξειδωση των λιπών. Ακόμη, πρέπει να αποφευχθεί η εξάτμιση του νερού και η φωτοχημική οξειδωση του τυριού. <sup>[15]</sup>

Μια μελετημένη εφαρμογή των πρωτεϊνικών φιλμ στην επικάλυψη τροφίμων είναι τα βρώσιμα φιλμ στο τυρί τσένταρ.<sup>[11]</sup> Το τυρί τσένταρ καθώς ωριμάζει μπορεί να έχει αλλοιώσεις από μικροοργανισμούς από μούχλα και αναερόβια βακτήρια. Η εφαρμογή συσκευασίας βρώσιμου φιλμ από καζεΐνη ή πρωτεΐνες ορού γάλακτος <sup>[15]</sup> μπορεί να λύσει αυτό το πρόβλημα της αλλοίωσης σε κάποιο βαθμό και να παρατείνει τη διάρκεια ζωής του τυριού.<sup>[11] [12]</sup> Ακόμη, έχει παρασκευαστεί επικάλυψη για τυρί τύπου Ricotta από χιτοζάνη και πρωτεΐνες ορού γάλακτος, φιλμ από καζεϊνικό νάτριο για την επικάλυψη ημίσκληρου τυριού και για το κασέρι έχουν χρησιμοποιηθεί φιλμ ζεΐνης και γλουτένης σίτου. <sup>[15]</sup>

Η κατάλληλη συσκευασία του κρέατος και των προϊόντων του επιτρέπει να διατηρηθεί η ποιότητα των πρωτεϊνών του. Προκειμένου οι συγκεντρώσεις του οξυγόνου και του διοξειδίου του άνθρακα να ρυθμιστούν στα κατάλληλα επίπεδα και να αποφευχθεί η παρουσία φωτός σε κρεατικά και αλλαντικά προϊόντα χρησιμοποιούνται συχνά πρωτεϊνικά φιλμ σε συνδυασμό με κάποιες μεθόδους συσκευασίας όπως υπό κενό, ασηπτική, τροποποιημένης ατμόσφαιρας, ενεργή κλπ. Για παράδειγμα, έχουν μελετηθεί φιλμ από απομονωμένη πρωτεΐνη σόγιας για μπιφτέκια μοσχαρίσιου κιμά, φιλμ από απομονωμένη πρωτεΐνη ορού γάλακτος για φρέσκα κομμάτια βοδινού και φιλμ από συμπύκνωμα πρωτεϊνών ορού γάλακτος για την επικάλυψη φιλέτων ιριδίζουσας πέστροφας. <sup>[15]</sup>

Η σωστή συσκευασία μπορεί να αποτρέψει αποτελεσματικά και την αλλοίωση των κατεψυγμένων τροφίμων. Η συσκευασία που προστατεύει τα κατεψυγμένα τρόφιμα από το φως και το οξυγόνο έχει αποδειχθεί ότι μειώνει την οξειδωση των χρωστικών και των λιπιδίων σε κατεψυγμένους σολομούς και κατεψυγμένες γαρίδες. Όταν τα ένζυμα δεν έχουν αφαιρεθεί με λεύκανση (για παράδειγμα, από λαχανικά), μπορεί να συμβεί οξειδωση που καταλύεται από ένζυμα χωρίς αποτελεσματικό φράγμα οξυγόνου. Η απώλεια υγρασίας που προκαλείται από την εξάχνωση της επιφάνειας των κατεψυγμένων τροφίμων οδηγεί σε εξασθένηση της οπτικής εμφάνισης, απώλειες βάρους κατεψυγμένων τροφίμων και εγκαύματα κατάψυξης στην επιφάνεια του τροφίμου. Η εξάχνωση των κατεψυγμένων τροφίμων μπορεί να αποφευχθεί προσαρμόζοντας στην επιφάνεια τους υλικά (φιλμ) αδιαπέραστα από υδρατμούς. Για παράδειγμα, τα φιλμ με βάση την πρωτεΐνη ορού γάλακτος που εφαρμόζονται σε φιλέτα σολομού Ατλαντικού μετά την κατάψυξη αυξάνουν την απόδοση απόψυξης, αλλάζουν τις χρωματικές παραμέτρους και καθυστερούν την λιπιδική οξειδωση των φιλέτων. Επίσης, έχει αποδειχθεί ότι η επικάλυψη με βάση την πρωτεΐνη ορού γάλακτος με αλγινικό νάτριο στα ψάρια *killca* μπορεί να βελτιώσει την ποιότητα του προϊόντος και να παρατείνει τη διάρκεια ζωής κατά την αποθήκευση σε

κατεψυγμένα έως και 6 μήνες. Γενικά, η εξαιρετική υδροφιλία των πρωτεϊνών επιτρέπει στις μεμβράνες με βάση τις πρωτεΐνες να προσκολλώνται καλά στην επιφάνεια των κατεψυγμένων τροφίμων και παρέχει ένα εμπόδιο στη διάχυση οξυγόνου και διοξειδίου του άνθρακα χωρίς να διακόπτεται η διάχυση του νερού.<sup>[15]</sup>

Τα βρώσιμα υλικά συσκευασίας είναι εύκολα βιοαποικοδομήσιμα με την πάροδο του χρόνου όπως και τα τρόφιμα που προορίζονται να προστατεύσουν.<sup>[12]</sup> Συγκεκριμένα, κοινοί μικροοργανισμοί μπορούν να διασπάσουν πρωτεϊνικές μεμβράνες ή οι πρωτεϊνικές μεμβράνες να λειτουργήσουν ως υποστρώματα για μικροβιακή ανάπτυξη. Επομένως, η μικροβιακή σταθερότητα της βρώσιμης πρωτεϊνικής μεμβράνης με την πάροδο του χρόνου δεν είναι βέβαιη. Επίσης, οι πρωτεϊνικές μεμβράνες που εφαρμόζονται σε προϊόντα τροφίμων που φέρουν πρωτεολυτικά ένζυμα, όπως προϊόντα κρέατος, μπορεί να αποικοδομηθούν πρόωρα κι έτσι χάνουν τη χρησιμότητά τους.<sup>[12]</sup>

Η χημική σταθερότητα είναι μια άλλη παράμετρος που μπορεί να επηρεάσει τη λειτουργικότητα των πρωτεϊνικών μεμβρανών και επικαλύψεων. Για παράδειγμα, οι ιδιότητες τέτοιων μεμβρανών μπορούν να επηρεαστούν ουσιαστικά από τις αντιδράσεις Maillard (μη ενζυμική αμαύρωση) με αναγωγικούς υδατάνθρακες που υπάρχουν στα τρόφιμα. Οι αντιδράσεις Maillard μπορούν επίσης να αλλάξουν το χρώμα των πρωτεϊνικών μεμβρανών.<sup>[12]</sup>

Η χρήση πρωτεϊνικών μεμβρανών στη συσκευασία τροφίμων εφαρμόζει αρχές της κυκλικής οικονομίας. Τα βιοπολυμερή δεν είναι μόνο αποικοδομήσιμα, αλλά οι πρώτες ύλες είναι ανανεώσιμες πηγές. Τα βιοπολυμερή προέρχονται από τη φύση και τελικά επιστρέφουν στη φύση. Ο κύκλος ζωής των βιοπολυμερικών υλικών συσκευασίας αποτελείται από: την αποδόμηση υλών, την χρήση τους στην ανάπτυξη ανανεώσιμων πηγών, την αξιοποίηση των ανανεώσιμων πηγών στην δημιουργία βιοπολυμερών, την χρήση των βιοπολυμερών στη συσκευασία και ξανά την αποδόμηση τους.<sup>[15]</sup>

## 1.4 Φυσικοί Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες (NADES)

### 1.4.1 Ορισμός και ιδιότητες

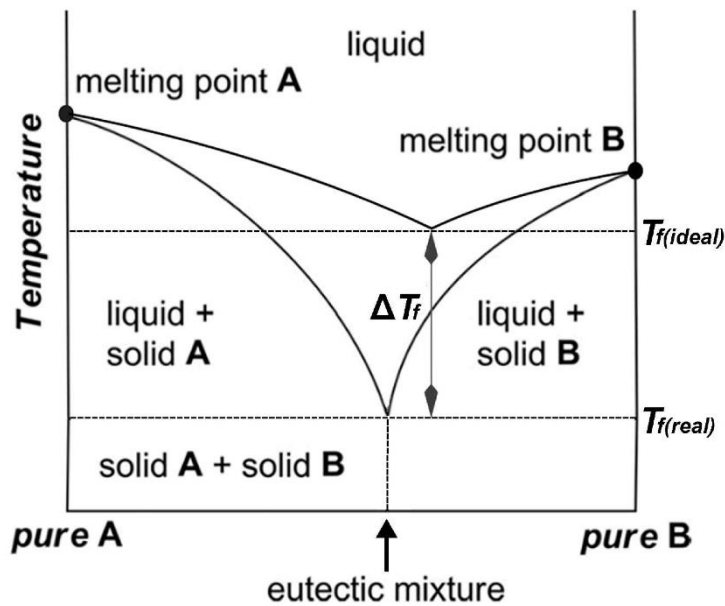
#### 1.4.1.1 DES

Ο Βαθέως Ευτηκτικός Διαλύτης (Deep Eutectic Solvent) είναι ένα μίγμα το οποίο αποτελείται από δύο τουλάχιστον συστατικά, ένα δέκτη δεσμού υδρογόνου (Hydrogen Bond Acceptor – HBA) και ένα δότη δεσμού υδρογόνου (Hydrogen Bond Donor – HBD), τα οποία μπορούν να αλληλεπιδράσουν δημιουργώντας μια νέα ευτηκτική φάση που χαρακτηρίζεται από σημείο τήξης πολύ χαμηλότερο από αυτό του κάθε συστατικού.<sup>[16][17][19]</sup> Συνήθως η μείωση του σημείου τήξης είναι 100–200°C.<sup>[20]</sup> Η μείωση του σημείου τήξης,  $\Delta T_f$ , ορίζεται ως <sup>[16]</sup>.

$$\Delta T_f = T_{f(real)} - T_{f(ideal)} \quad (1)$$

Όπου  $T_{f(real)}$  είναι το μετρούμενο σημείο πήξης ενός μείγματος στην ευτηκτική σύνθεση και  $T_{f(ideal)}$  είναι το θεωρητικά προβλεπόμενο σημείο πήξης για ένα ιδανικό μείγμα.

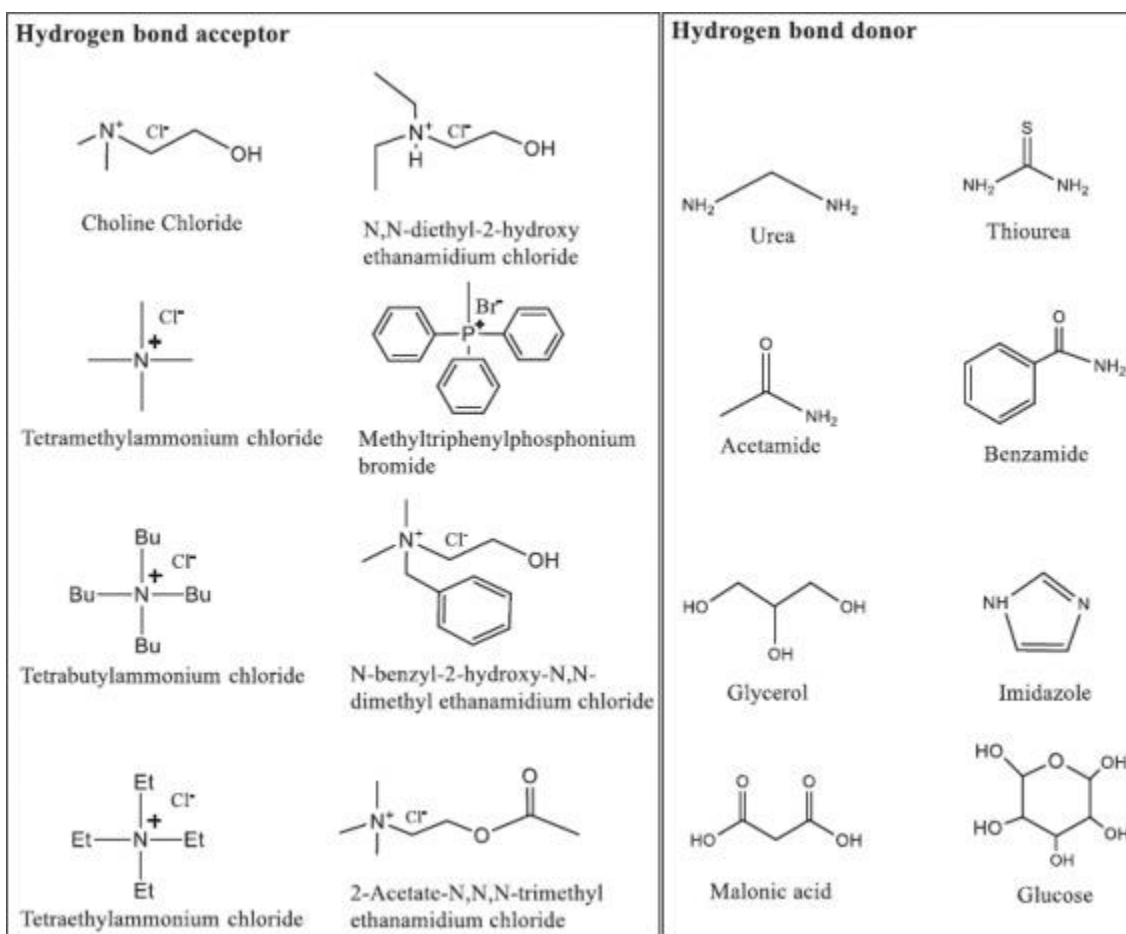
Στο παρακάτω διάγραμμα φάσης (Διάγραμμα 1) φαίνεται η διαφορά του σημείου τήξης του μίγματος δύο συστατικών και του ευτηκτικού τους μίγματος <sup>[16]</sup>.



Διάγραμμα 1: Το διάγραμμα φάσης ενός μίγματος δύο συστατικών που αντιπροσωπεύει το ευτηκτικό σημείο. Το  $T_{f(real)}$  είναι το μετρούμενο σημείο πήξης ενός μίγματος στην ευτηκτική σύνθεση και το  $T_{f(ideal)}$  είναι το θεωρητικά προβλεπόμενο σημείο πήξης για ένα ιδανικό μείγμα.

Το ευτηκτικό μίγμα είναι ομογενές υγρό που χαρακτηρίζεται από υπερμοριακή δομή και τα συστατικά του αλληλεπιδρούν μεταξύ τους με ισχυρές διαμοριακές δυνάμεις, κυρίως δεσμούς υδρογόνου. <sup>[16]</sup> Σε αντίθεση με τους συμβατικούς οργανικούς διαλύτες, οι οποίοι συνήθως έχουν ομοιογενές σύστημα δεσμών υδρογόνου, στα DES σχηματίζονται «πακέτα» ώστε να μεγιστοποιείται το δίκτυο δεσμών υδρογόνου μεταξύ των διαφορετικών χημικών ενώσεων που αποτελούν τα συστατικά του DES. Τελικά, σχηματίζεται ένα περίπλοκο δίκτυο αλληλεπιδράσεων που είναι αποτέλεσμα της ευαίσθητης ισορροπίας μεταξύ όλων των δυνάμεων που συμμετέχουν. <sup>[16]</sup>

Στο παρακάτω σχήμα (Σχήμα 4) φαίνονται κάποιες τυπικές δομές δοτών και δεκτών δεσμών υδρογόνου που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως συστατικά των βαθέως ευτηκτικών διαλυτών. <sup>[24]</sup>



Σχήμα 4: Τυπικές δομές δωτών και δεκτών δεσμών υδρογόνου [24]

Για την παρασκευή των DES χρειάζεται απλή ανάμειξη των συστατικών και στη συνέχεια απλή θέρμανση ή λυοφιλοποίηση. Σημαντικό χαρακτηριστικό τους για την ένταξη τους στην κατηγορία των «πράσινων» διαλυτών είναι η βιοαποικοδομησιμότητά τους και η μη τοξικότητά τους. Αποτελούνται από φυσικές πρώτες ύλες και δεν αφήνουν παραπροϊόντα κατά την παραγωγή τους. [16] Τα DES παρουσιάζουν ενδιαφέρουσες ιδιότητες παρόμοιες με εκείνες των ιοντικών υγρών (ILs), συμπεριλαμβανομένης της αμελητέας πτητικότητας, της υψηλής αγωγιμότητας, της μη αναφλεξιμότητας. [19]

Γενικά οι DES μπορούν να περιγραφούν από τη μορφή  $Cat^+X^-zY$ , στην οποία το  $Cat$  είναι οποιοδήποτε κατιόν αμμωνιακού, σουλφονιακού ή φωσφονιακού άλατος και το  $X$  ένα μόριο - βάση κατά Lewis, συνήθως ένα ανιόν αλογόνου. Το  $Y$  είναι μια βάση κατά Lewis ή Bronsted. [16][24] Περίπλοκες μορφές αλληλεπιδράσεων αναπτύσσονται μεταξύ του  $X^-$  και  $Y$ , με κυριότερες να είναι οι δεσμοί υδρογόνου. Ωστόσο περιστασιακές ηλεκτροστατικές δυνάμεις και δυνάμεις Van der Waals είναι επίσης πιθανό να εμφανιστούν. [24] Πειραματικές και θεωρητικές μελέτες έχουν δείξει πως γενικά, το μεγαλύτερο ποσοστό δεσμών υδρογόνου στο DES είναι διαμοριακές και πραγματοποιούνται μεταξύ του HBD και του αλογόνου. [17] Το πλέγμα δεσμών υδρογόνου που αναπτύσσεται αποτελεί τη βάση για τις βασικές ιδιότητες των DES. [16][24]

Τα DES ταξινομούνται με βάση την φύση των δωτών υδρογόνου τους. Οι κυριότερες κατηγορίες βαθέως ευτηκτικών διαλυτών παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα. [16][24]

Πίνακας 6: Κυριότερες κατηγορίες DES <sup>[16][24]</sup>

Τύπος	Χημικός Τύπος	Όροι
I	$Cat^+X^-zMCl_x^-$	M: Zn, Sn, Fe, Al, Ga, In
II	$Cat^+X^-zMCl_x\gamma H_2O$	M: Cr, Co, Cu, Ni, Fe
III	$Cat^+X^-zRZ$	Z: CONH <sub>2</sub> , COOH, OH
IV	$MCl_x^+RZ=MCl_{x-1}^+RZ+MCl_{x+1}^-$	M: Al, Zn. Z: CONH <sub>2</sub> , OH

#### 1.4.1.2 NADES

Τα ευτηκτικά μίγματα που προέρχονται από την ανάμιξη φυσικών μορίων σε συγκεκριμένες αναλογίες αναφέρονται ως Φυσικοί Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες (Natural Deep Eutectic Solvents-NADES).<sup>[20]</sup> Οι NADES μπορούν να σχηματιστούν μέσα σε φυτικά κύτταρα και να δημιουργήσουν ένα εναλλακτικό ως προς το νερό μέσο για τη διατήρηση της λειτουργίας των ενδοκυτταρικών βιοχημικών αντιδράσεων αλλά και τη διαλυτοποίηση, αποθήκευση και μετακίνηση μη-υδατοδιαλυτών δευτερογενών μεταβολιτών (όπως τα φαινολικά παράγωγα, τα φλαβονοειδή και οι ανθοκυανίνες).<sup>[16]</sup> Εκτός αυτού, το δίκτυο δεσμών υδρογόνου που σχηματίζουν τα NADES, συγκρατεί τα ελάχιστα μόρια H<sub>2</sub>O που υπάρχουν εντός του κυττάρου ενώ το χαμηλό ευτηκτικό σημείο αποτρέπει το πάγωμα των κυτταρικών μεμβρανών.<sup>[21]</sup>

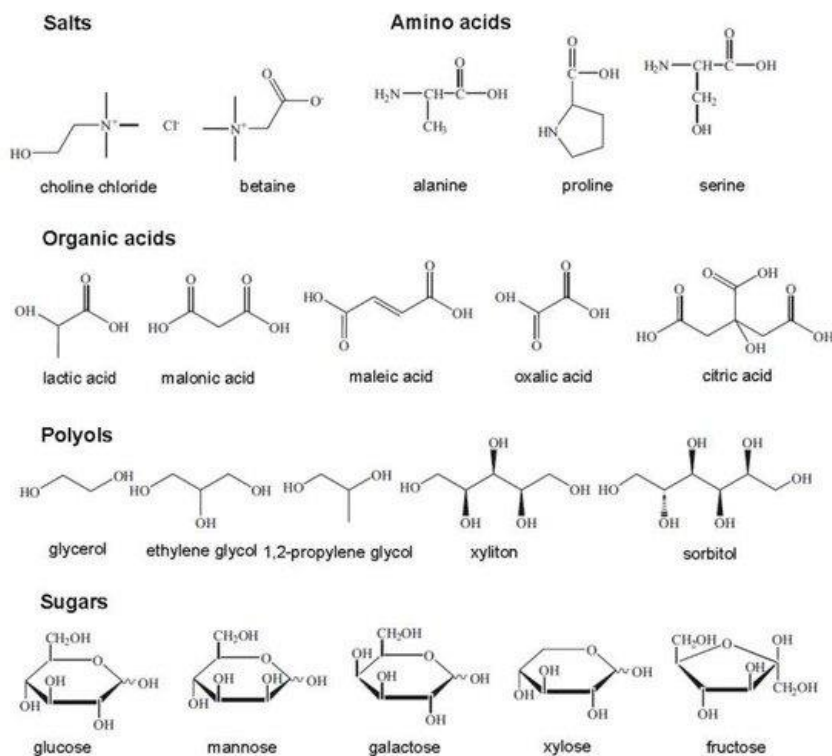
Φυσικοί βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες (NADES) υπάρχουν στα ζωντανά κύτταρα, διαφορετικοί από το νερό και τα λιπίδια, και παίζουν σημαντικό ρόλο ως εναλλακτικό μέσο για τη βιοσύνθεση, τη μεταφορά και την αποθήκευση ενώσεων με ενδιάμεση πολικότητα. Τα NADES έχουν κεντρικό ρόλο στη διατήρηση του μεταβολισμού στα φυτά σε περίπτωση απουσίας νερού κατά τη διάρκεια της ξηρασίας ή του κρύου.<sup>[18]</sup>

Κύριο χαρακτηριστικό των NADES είναι ότι διαλυτοποιούν δυσδιάλυτα συστατικά στα φυτικά κύτταρα και βιοδραστικά μόρια αλλά μπορούν να δράσουν και σταθεροποιητικά.<sup>[16][21]</sup> Επιπλέον, ένα NADES αποδομείται σε υψηλότερες θερμοκρασίες, περίπου κατά 15°C αυξημένες από τα δύο συστατικά, σε σύγκριση με το φυσικό μίγμα. Αυτό συμβαίνει λόγω του πλέγματος δεσμών υδρογόνου μεταξύ των ενώσεων του NADES.<sup>[20]</sup> Κατά τη μελέτη της θερμικής συμπεριφοράς παρέχεται ενέργεια στο σύστημα με τη μορφή θερμότητας. Το σύστημα που έχει σχηματιστεί στο NADES απαιτεί επιπλέον ενέργεια για την αποδόμηση του, καθώς πρέπει πρώτα να διασπαστεί το πλέγμα των δεσμών υδρογόνου και έπειτα τα ίδια τα μόρια.<sup>[17]</sup> Αυτή η επιπλέον απαίτηση σε ενέργεια μπορεί να μεταφραστεί στη μετατόπιση των θερμοκρασιών αποδόμησης των μορίων σε υψηλότερες θερμοκρασίες.

Λόγω της φύσης των DES με δεσμό H, τα περισσότερα είναι αναμίξιμα με νερό και υγροσκοπικά, και τα υδατικά μείγματα DES (έως 50 wt% H<sub>2</sub>O) εμφανίζουν τροποποιημένες φυσικές ιδιότητες, όπως δραστικά μειωμένο ιξώδες.<sup>[21]</sup>

Οι πιο συνηθισμένοι NADES είναι μίγματα οργανικών οξέων/σακχαρών, αμινοξέων/οργανικών οξέων και αμινοξέων/σακχαρών. Συχνά παρασκευάζονται NaDES από μίγματα χλωριδίου της χολίνης (ChCl) με πλήθος φυσικών προϊόντων, όπως ChCl/οργανικά οξέα, ChCl/αλκοόλες, ChCl/σάκχαρα.

Στο παρακάτω σχήμα φαίνονται κάποιες τυπικές ενώσεις δοτών και δεκτών δεσμών υδρογόνου που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως συστατικά των φυσικών βαθέως ευτηκτικών διαλυτών.<sup>[16]</sup>



Σχήμα 5: Φυσικά συστατικά που χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση φυσικών βαθέως ευτηκτικών διαλυτών <sup>[16]</sup>

Με βάση τα συστατικά τους, τα NADES μπορούν να χωριστούν σε πέντε βασικές κατηγορίες NADES που αποτελούνται από:

1. ένα οξύ ή μια βάση
2. μόνο από σάκχαρα ή σάκχαρα και πολυαλκοόλες (ουδέτερα DES)
3. σάκχαρα/πολυαλκοόλες και οργανικά οξέα (ουδέτερα DES με οξέα)
4. σάκχαρα/πολυαλκοόλες και οργανικές βάσεις (ουδέτερα DES με βάσεις)
5. αμινοξέα και οργανικά οξέα ή σάκχαρα

#### 1.4.2 Πλεονεκτήματα

Οι βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες αποτελούν σημαντική κατηγορία πράσινων διαλυτών και πλεονεκτούν έναντι των συμβατικών διαλυτών. Αρχικά, οι DES έχουν χαμηλό ενεργειακό και οικονομικό κόστος παραγωγής και πολύ χαμηλό περιβαλλοντικό αποτύπωμα. <sup>[16][21]</sup> Επιπλέον, παρασκευάζονται με απλή ανάμειξη συστατικών και στη συνέχεια θέρμανση (συμβατική, με υπερήχους ή μικροκύματα) ή λυοφιλοποίηση, χωρίς να παράγουν κάποιο παραπροϊόν ή να απαιτούν κάποιο στάδιο καθαρισμού. <sup>[16]</sup> Οι DES είναι αποτέλεσμα συμπλοκοποίησης μεταξύ ενός HBA και ενός HBD, των οποίων οι αλληλεπιδράσεις περιλαμβάνουν κατά κύριο λόγο δεσμούς υδρογόνου. Επίσης, είναι βιοαποικοδομήσιμοι, χημικά σταθεροί, αποτελούνται από μη τοξικές, ανανεώσιμες και φυσικές πρώτες ύλες και έχουν την ικανότητα να διαλύουν πολικές και μη πολικές ενώσεις. <sup>[16][17][19]</sup> Τέλος, τα κοινά συστατικά των DESs είναι φυσικές βιοσυμβατές ενώσεις που δεν είναι επικίνδυνες εάν απελευθερωθούν πίσω στη φύση. <sup>[19]</sup>

Οι φυσικοί βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες εκτός από τα πλεονεκτήματα όλων των DES έχουν ακόμη περισσότερα σε σχέση με άλλους πράσινους διαλύτες.<sup>[16][17]</sup> Όπως αναφέρθηκε, οι NADES διαλυτοποιούν δυσδιάλυτα συστατικά στα φυτικά κύτταρα και βιοδραστικά μόρια αλλά και δρουν ως μέσα σταθεροποίησης ευπαθών ενώσεων (για τα βιοδραστικά προϊόντα τα οποία εκχυλίζουν), εξαιτίας του δικτύου δεσμών υδρογόνου που δημιουργείται.<sup>[16][20]</sup> Επιπλέον, οι NADES είναι εξαιρετικοί νέας γενιάς διαλύτες εκχύλισης και έχουν χαμηλή τάση ατμών με μεγάλο θερμοκρασιακό εύρος υγρής κατάστασης. Εκτός της βιοσυμβατότητας και του χαμηλού κόστους παραγωγής τους, η παρασκευή τους είναι εύκολη με δυνατότητα ανακλιμάκωσης.<sup>[16]</sup> Τέλος, οι NADES είναι πολυλειτουργικοί και μπορούν να παρασκευαστούν από φυσικά προϊόντα συμβατά με εφαρμογές σε φαρμακευτικά, καλλυντικά και προϊόντα τροφίμων.

### 1.4.3 Χρήσεις

Οι NADES είναι πολυλειτουργικοί και μπορούν να χρησιμοποιηθούν με μεθόδους που ακολουθούν την πράσινη χημεία και θα αναλυθούν παρακάτω. Παρά τις ευρέως αναγνωρισμένες δυνατότητες των DES στην επιστήμη των πολυμερών, η εφαρμογή αυτών των μέσων για την παρασκευή πολυμερών υλικών με βελτιωμένα λειτουργικά, δομικά και μορφολογικά χαρακτηριστικά είναι ένα σχετικά πρόσφατο ερευνητικό θέμα και επομένως ακόμη μάλλον ανεξερεύνητο. Τα DES έχουν χρησιμοποιηθεί στην επιστήμη των πολυμερών ως διαλύτες, λειτουργικά πρόσθετα και μονομερή.<sup>[24]</sup>

Οι NADES αποτελούν «πράσινα» μέσα σύνθεσης και επεξεργασίας υλικών. Έχει αποδειχθεί η δυνατότητα χρήσης τους ως πλαστικοποιητές πολυμερών για την ανάπτυξη τρισδιάστατων πορωδών δομών, οι οποίες βρίσκουν εφαρμογή σε πλήθος επιστημονικών πεδίων, κυρίως στην αναλυτική χημεία. Άλλο ένα πολλά υποσχόμενο πεδίο είναι η νανοτεχνολογία, συγκεκριμένα η σύνθεση νανοσωματιδίων, εξαιτίας της καλής θερμικής σταθερότητας, καλής ικανότητας για διασπορά και μεγάλης ιοντικής αγωγιμότητας.<sup>[17][21]</sup> Μετά τη σύνθεση τους, τα υλικά αυτά εφαρμόζονται σε πλήθος αναλυτικών διεργασιών όπως η εκχύλιση, ο διαχωρισμός καθώς και η ενίσχυση ορίων ανίχνευσης.

Οι NADES είναι ικανοποιητικοί διαλύτες μεγάλου εύρους πολικών αλλά και άπολων μορίων.<sup>[19]</sup> Η διαλυτοποίηση μπορεί να ελέγχεται από την προσθήκη συνδιαλύτη (συνήθως νερού), ο οποίος βελτιώνει τη διαλυτική ικανότητα αλλά και ελαττώνει το ιξώδες του NADES. Η ιδιότητα αυτή, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι μπορούν εύκολα να παρασκευαστούν στοχευμένα για κάθε εφαρμογή, τους καθιστά ιδιαίτερα ελκυστικούς διαλύτες για εκχύλιση φυσικών πρώτων υλών.<sup>[19][20]</sup> Ιδιαίτερα ενδιαφέρον στη χρήση NADES ως διαλύτες εκχύλισης είναι επίσης το γεγονός ότι το πλέγμα δυνάμεων που αναπτύσσεται μεταξύ διαλύτη και εκχυλίσματος προστατεύει τις ουσίες από υποβάθμιση τους. Συνεπώς δεν καθίσταται απαραίτητη η απομόνωση των ουσιών από το διαλύτη καθώς αυτός δρα και ως «αποθηκευτικό μέσο».<sup>[20]</sup>

Οι DESs και οι NADESs χρησιμοποιούνται συχνά στην παραγωγή βιοκαυσίμων και βιοελαίων ως μέσα αντίδρασης ή εκχυλιστικοί διαλύτες και ως μέσα ρύθμισης των διαμοριακών αλληλεπιδράσεων. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει δοθεί στα υπολείμματα τροφίμων και στους πόρους βιομάζας, στην επίλυση περιβαλλοντικών ζητημάτων που σχετίζονται με τη διαχείριση αποβλήτων προϊόντων και στην αξιοποίηση αυτών των πόρων για την παραγωγή πράσινων καυσίμων. Έτσι, οι βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε διεργασίες εκχύλισης προς μετασχηματισμό βιοαποβλήτων.<sup>[16]</sup>



#### 1.4.4 Εφαρμογή στη βιομηχανία τροφίμων

Στη βιομηχανία τροφίμων οι DES/NADES χρησιμοποιούνται ως παράγοντες κατά την προεπεξεργασία, διαλύτες, συνδιαλύτες ή καταλύτες. Όπως αναφέρθηκε, σε αρκετές περιπτώσεις στόχος είναι η παραγωγή βιοκαυσίμων με πρώτη ύλη τη βιομάζα. Εκεί, τα DES ή τα NADES χρησιμοποιούνται για κλασματοποίηση και προεπεξεργασία λιγνοκυτταρινικής βιομάζας για περαιτέρω επεξεργασία και/ή για επιλεκτική απομόνωση επιθυμητών συστατικών.<sup>[16]</sup> Ακόμη, χρησιμοποιούνται ευρέως για την εξαγωγή επιθυμητών χημικών ουσιών από διαφορετικά υλικά. Τα υπολείμματα τροφών περιέχουν σημαντικές ποσότητες πρωτεϊνών, λιπιδίων και υδατανθράκων που μπορούν να εξαχθούν και με τη βοήθεια των βαθέως ευτηκτικών διαλυτών.<sup>[16]</sup>

Οι DES/NADES χρησιμοποιούνται ως διαλύτες στην προεπεξεργασία της βιομάζας. Η μετατροπή των υπολειμμάτων τροφίμων ή της βιομάζας σε βιοκαύσιμα συνήθως αποτελείται από πολλά διαδοχικά στάδια. Η προεπεξεργασία, ως βασικό στάδιο στη βιομετατροπή της βιομάζας και των υπολειμμάτων τροφίμων, περιλαμβάνει την ενζυμική υδρόλυση της λιγνοκυτταρινικής βιομάζας. Μια διαδικασία προεπεξεργασίας μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να διευκολυνθεί η εκχύλιση με διαλύτη. Τα DES και NADES έχουν εισαχθεί ως πράσινα μέσα προεπεξεργασίας. Η δύναμη αυτών των διαλυτών να διαλύουν το συστατικό της σκληρής λιγνίνης της βιομάζας έχει ανοίξει το δρόμο για την προεπεξεργασία της βιομάζας υπό ήπιες συνθήκες.<sup>[16]</sup>

Οι DES/NADES αξιοποιούνται συχνά ως μέσα εκχύλισης και απομόνωσης βιοδραστικών ενώσεων. Εφόσον τα DES και τα NADES αποτελούνται από απλά και φυσικά απαντώμενα συστατικά, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την εκχύλιση επιθυμητών ενώσεων όπως πρωτεϊνών, πεπτιδίων, φαινολικών ενώσεων κ.λπ. από φυτά ή άλλες πρώτες ύλες. Η απόδοση της εκχύλισης μπορεί να επηρεαστεί από την μοριακή αναλογία των συστατικών των DES, τη θερμοκρασία εκχύλισης και την αναλογία διαλύτη προς δείγμα.<sup>[16]</sup>

Ταυτόχρονα, οι βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως καταλύτες ή συνδιαλύτες στην υδροθερμική υγροποίηση της βιομάζας. Συγκεκριμένα, ως ομογενείς καταλύτες, θα μπορούν να έχουν διπλό ρόλο καταλύτη και συνδιαλύτη, μειώνοντας τον χρόνο αντίδρασης και ενισχύοντας την ομοιογένεια. Κάτω από ορισμένες συνθήκες, ένας DES μπορεί να λειτουργήσει ως καταλύτης σε μια βιομετατροπή.<sup>[16]</sup>

Οι φυσικοί βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες έχουν που αποτελούνται από φυσικούς πρωτογενείς μεταβολίτες, έχουν εφαρμοστεί σε διάφορες στρατηγικές τα τρόφιμα για τη σταθεροποίηση των συστατικών τους και τη βελτίωση της οξειδωτικής σταθερότητας. Εάν τα NADES υπάρχουν στα ζωντανά κύτταρα ως τρίτη κατηγορία υγρών που διαφέρει από το νερό και τα λιπίδια, είναι λογικό να υποθέσουμε ότι τα NADES είτε υπάρχουν είτε σχηματίζονται σε συστήματα τροφίμων κατά την επεξεργασία (π.χ. ξήρανση και ψύξη) και επηρεάζουν τη σταθερότητά τους.<sup>[18]</sup>

Η συντήρηση τροφίμων εφαρμόζει έναν αριθμό διαφορετικών ενεργειών και τεχνικών επεξεργασίας για τη διατήρηση των επιθυμητών ιδιοτήτων των τροφίμων κατά τη διάρκεια της καθορισμένης διάρκειας ζωής, ώστε να διατηρούνται ασφαλή και ευχάριστα στην κατανάλωση. Το κατάλληλο υλικό συσκευασίας μπορεί να παρατείνει τη διάρκεια ζωής των τροφίμων. Ωστόσο, τα συνθετικά πολυμερή που χρησιμοποιούνται παραδοσιακά για την παραγωγή τους έχουν προκαλέσει σοβαρό οικολογικό πρόβλημα με την παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων απορριμμάτων, τα οποία μπορεί να είναι τοξικά για τη βιολογική ζωή

λόγω της συνολικής μη βιοαποικοδομησιμότητας τους. Έτσι, όπως έχει αναφερθεί, έχει αυξηθεί η ζήτηση για υλικά συσκευασίας που βασίζονται στα βιοπολυμερή. Οι NADES μπορούν να εφαρμοστούν ως πλαστικοποιητές στην παρασκευή βρώσιμων φιλμ.<sup>[18]</sup>

#### 1.4.5 Βιοπολυμερικά φιλμ με NADES

Έχει μελετηθεί η χρήση των DES με βάση τη χλωριούχο χολίνη ως πλαστικοποιητές σε βιοπολυμερικές μεμβράνες. Συγκεκριμένα, έχει αποδειχθεί ότι συνέβαλαν στην αύξηση της ευκαμψίας και της οπτικής διαφάνειας των φιλμ αγαρόζης ενώ το DES με χλωριούχο χολίνη-ουρία θεωρείται επίσης αποτελεσματικός πλαστικοποιητής για το άμυλο αραβοσίτου.<sup>[22][24]</sup> Επιπλέον, DES χλωριούχου χολίνης-ουρίας και χλωριούχου χολίνης-γλυκερόλης έχουν χρησιμοποιηθεί για την παρασκευή φιλμ από άγαρ. Οι μεμβράνες άγαρ με DES είχαν καλή μηχανική αντίσταση και αυξημένη ελαστικότητα σε σύγκριση με τις τυπικές υδατικές μεμβράνες άγαρ. Ακόμη, DES από χλωριούχο χολίνη-γλυκερόλη έχουν συμβάλει στην ομογενοποίηση της διασποράς και της μεμβράνης που σχηματίζει φιλμ χιτοζάνης, με καλύτερη διασπορά της μικροκρυσταλλικής κυτταρίνης και των σωματιδίων της κουρκουμίνης.<sup>[22]</sup> Τα φιλμ χιτοζάνης με πλαστικοποιητή NADES εμφάνισαν υψηλότερη αντοχή εφελκυσμού και βελτιωμένες τιμές διαπερατότητας υδρατμών και υδατοδιαλυτότητας σε σχέση με τα απλά φιλμ χιτοζάνης.<sup>[22]</sup> Σε άλλη έρευνα σύγκρισης φιλμ χιτοζάνης με και χωρίς NADES ως πλαστικοποιητές, παρατηρήθηκε ότι οι μεμβράνες που περιέχουν NADES ή οι μεμβράνες που περιέχουν το φυσικό μείγμα των αντίστοιχων NADES είναι πολύ ελαστικές και επιτρέπουν στο νερό να περάσει εύκολα.<sup>[23]</sup> Από την άλλη, οι μεμβράνες που δεν περιέχουν NADES ήταν ανελαστικές και πολύ ανθεκτικές στη ρήξη.<sup>[23]</sup>

Τα πρωτεϊνικά φιλμ χρειάζονται πλαστικοποιητές για την βελτίωση της δομής και των ιδιοτήτων τους, όπως αναφέρθηκε. Οι NADES, ως «πράσινα» μέσα σύνθεσης και επεξεργασίας υλικών με υψηλή βιοδιαθεσιμότητα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πλαστικοποιητές βιοπολυμερών για την αύξηση της σταθερότητας τους. Λόγω του ρόλου που διαδραματίζουν τα βιοπολυμερή στη βιομηχανία βιοπλαστικών, τα DES αναγνωρίζονται ως πολλά υποσχόμενοι διαλύτες ή πρόσθετα.<sup>[24]</sup>

Οι βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες σήμερα αποτελούν ένα ουσιαστικό εργαλείο για την παραγωγή καινοτόμων και εξελιγμένων υλικών και έχουν συμβάλει σημαντικά στην ανάπτυξη νέων βιώσιμων, αποτελεσματικών, οικονομικών και φιλικών προς το περιβάλλον διαδικασιών. Το πεδίο εφαρμογής πρωτεϊνικών φιλμ με NADES είναι μεγάλο και υπάρχει πολύς χώρος για μελλοντική έρευνα και νέες ανακαλύψεις.

## 2. Πειραματικό μέρος

### 2.1. Όργανα και Υλικά

Στους πίνακες που ακολουθούν καταγράφονται όλα τα όργανα, οι συσκευές και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνθεση και το χαρακτηρισμό των βαθέως ευτηκτικών διαλυτών και των πρωτεϊνικών φιλμ.

Πίνακας 6: Όργανα και συσκευές

Όργανο - Συσκευή	Κατασκευαστής	Μοντέλο
Ζυγός ακριβείας	KERN	ADJ 200-4
Μαγνητικός αναδευτήρας με θερμαινόμενη εστία	Radleys	Carousel Standard
Αναδευτήρας vortex	IBX instruments	V05
Ηλεκτρονικό παχύμετρο (digital micrometer, 0-25mm)	Hogetex	-
Πεχάμετρο	Metrohm	744
Υδατόλουτρο	J. P Selecta	Precistern
Φασματοφωτόμετρο δειγματοφορέα πηγαδιών - Microplate Reader	BioTek	EPOCH2
Φασματοφωτόμετρο UV-Vis	Jasco	V-770 UV-Vis/NIR
Φασματόμετρο FT-IR	Bruker	ALPHA II
Αναλυτής υφής	Stable Micro Systems	TA-XT2i
Εκκολαπτήριο (Incubator)	Gallenkamp	-
Θερμοβαρυσμετρικός αναλυτής (TGA)	Mettler Toledo	TGA/DSC 1
Probe Υπερήχων	Sonics and Materials Inc	Vibra-Cell
Ανακινητήρας (Shaker)	Gallenkamp	-

Πίνακας 7: Αντιδραστήρια

Αντιδραστήριο	Χημικός τύπος	Προμηθευτής
Απιονισμένο νερό	$H_2O$	-
Αιθανόλη	$C_2H_5OH$	Sigma - Aldrich
Άνυδρη Βεταΐνη	$C_5H_{11}NO_2$	Glentham
Άνυδρη Γλυκερόλη	$C_3H_8O_3$	Penta
Χλωριούχος χολίνη	$C_5H_{14}ClNO$	Alfa Glentham
L-Προλίνη	$C_5H_9NO_2$	Glentham
Καυστικό Νάτριο	$NaOH$	Panreac
Οξικό Νάτριο	$C_2H_3O_2Na$	Fluka-Garantie
Καυστικό Νάτριο	$NaOH$	Penta
Ερυθρό του Νείλου (δείκτης)	$C_{20}H_{18}N_2O_2$	Glentham Life Sciences
Καζεΐνη	-	Glentham
Απομονωμένη πρωτεΐνη ορού γάλακτος	-	NOCarb

## 2.2. Σύνθεση NADES

Για την παρασκευή των NADES, ζυγίστηκαν οι απαιτούμενες ποσότητες των αρχικών συστατικών σε ζυγό ακριβείας. Έπειτα, μεταφέρθηκαν σε σφαιρική φιάλη, όπου παρασκευάστηκαν σύμφωνα με τη μέθοδο θέρμανσης με ανάδευση [25]. Η ανάμιξη έγινε σε μαγνητικό αναδευτήρα με ήπια θέρμανση. Η ανάδευση και η θέρμανση συνεχίστηκαν έως ότου σχηματιστεί ένα τελικό διαυγές ρευστό χωρίς υπολείμματα των αρχικών συστατικών. Μετά την ολοκλήρωση της παρασκευής, ο κάθε διαλύτης αποθηκεύτηκε σε ξηρό περιβάλλον σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Στη συνέχεια περιγράφεται αναλυτικότερα η σύνθεση του κάθε NADES ξεχωριστά:

### 2.2.1 NADES Betaine : Glycerol 1:2 (Bet-Gly 1:2)

Σε σφαιρική φιάλη των 20mL προστίθενται 3g (0,0256mol) βεταΐνη και 4,717g ή 3,743mL (0,0512mol) γλυκερόλη ( $\rho=1,26\text{g}/\text{cm}^3$ ) έτσι ώστε να προκύψει μείγμα με γραμμομοριακή αναλογία βεταΐνης-γλυκερόλης 1:2. Το μίγμα θερμαίνεται σε ελαιόλουτρο με μαγνητική ανάδευση στους 70°C έως ότου το μίγμα γίνει ένα ομοιογενές και διαυγές ρευστό, δηλαδή για περίπου 30min. Έπειτα, το NADES Bet-Gly 1:2 μεταγγίζεται σε γυάλινο φιαλίδιο και αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου.

### 2.2.2 NADES Betaine : Glycerol : Water 1:2:1 (Bet-Gly-W 1:2:1)

Σε σφαιρική φιάλη των 20mL προστίθενται 3g (0,0256mol) βεταΐνη, 4,717g ή 3,743mL (0,0512mol) γλυκερόλη ( $\rho=1,26\text{g}/\text{cm}^3$ ) και 0,46mL νερό έτσι ώστε να προκύψει μείγμα με γραμμομοριακή αναλογία βεταΐνης-γλυκερόλης-νερού 1:2:1. Το μίγμα θερμαίνεται σε ελαιόλουτρο με μαγνητική ανάδευση στους 70°C έως ότου το μίγμα γίνει ένα ομοιογενές και διαυγές ρευστό, δηλαδή για περίπου 30min. Έπειτα, το NADES Bet-Gly-W 1:2:1 μεταγγίζεται σε γυάλινο φιαλίδιο και αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου.

### 2.2.3 NADES Choline Chloride : Glycerol 1:2 (ChCl-Gly 1:2)

Σε σφαιρική φιάλη των 20mL προστίθενται 3,00g (0,0215mol) χλωριούχου χολίνης και 3,96g ή 3,14mL (0,043mol) γλυκερόλη ( $\rho=1,26\text{g}/\text{cm}^3$ ) έτσι ώστε να προκύψει μείγμα με γραμμομοριακή αναλογία χλωριούχου χολίνης-γλυκερόλης 1:2. Το μίγμα θερμαίνεται σε ελαιόλουτρο με μαγνητική ανάδευση στους 60°C έως ότου το μίγμα γίνει ένα ομοιογενές και διαυγές ρευστό, δηλαδή για περίπου 20min. Έπειτα, το NADES ChCl-Gly 1:2 μεταγγίζεται σε γυάλινο φιαλίδιο και αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου.

### 2.2.4 NADES Choline Chloride : Glycerol : Water 1:2:1 (ChCl-Gly-W 1:2:1)

Σε σφαιρική φιάλη των 20mL προστίθενται 3,00g (0,0215mol) χλωριούχου χολίνης, 3,96g ή 3,14mL (0,043mol) γλυκερόλη ( $\rho=1,26\text{g}/\text{cm}^3$ ) και 0,39mL νερό έτσι ώστε να προκύψει μείγμα με γραμμομοριακή αναλογία χλωριούχου χολίνης-γλυκερόλης-νερού 1:2:1. Το μίγμα θερμαίνεται σε ελαιόλουτρο με μαγνητική ανάδευση στους 70°C έως ότου το μίγμα γίνει ένα ομοιογενές και διαυγές ρευστό, δηλαδή για περίπου 20min. Έπειτα, το NADES ChCl-Gly-W 1:2:1 μεταγγίζεται σε γυάλινο φιαλίδιο και αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου.

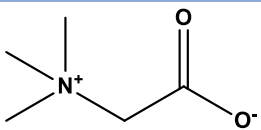
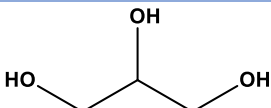
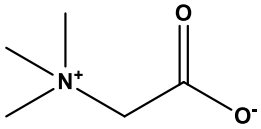
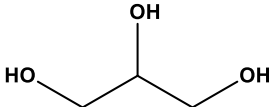
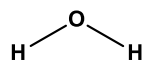
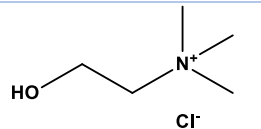
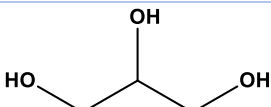
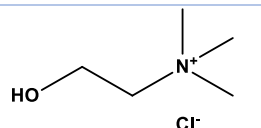
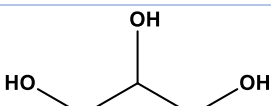
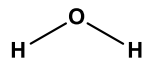
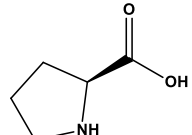
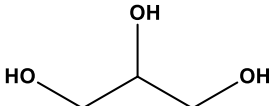
## 2.2.5 NADES L-Proline : Glycerol 1:2 (Pro-Gly 1:2)

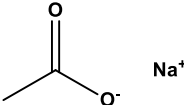
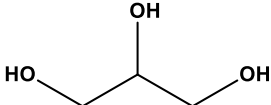
Σε σφαιρική φιάλη των 20mL προστίθενται 1,875g (0,0163mol) L-προλίνης και 3,00g ή 2,38mL (0,0326mol) γλυκερόλη ( $\rho=1,26\text{g/cm}^3$ ) έτσι ώστε να προκύψει μείγμα με γραμμομοριακή αναλογία L-προλίνης-γλυκερόλης 1:2. Το μίγμα θερμαίνεται σε ελαιόλουτρο με μαγνητική ανάδευση στους 70°C έως ότου το μίγμα γίνει ένα ομοιογενές και διαυγές ρευστό, δηλαδή για περίπου 2h30min. Έπειτα, το NADES Pro-Gly 1:2 μεταγγίζεται σε γυάλινο φιαλίδιο και αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου.

## 2.2.6 NADES Sodium acetate : Glycerol 1:9 (Sodium Acetate-Gly 1:9)

Σε σφαιρική φιάλη των 20mL προστίθενται 0,2969g (0,00362mol) οξικού νατρίου και 3,00g ή 2,38mL (0,0326mol) γλυκερόλη ( $\rho=1,26\text{g/cm}^3$ ) έτσι ώστε να προκύψει μείγμα με γραμμομοριακή αναλογία οξικού νατρίου-γλυκερόλης 1:9. Το μίγμα θερμαίνεται σε ελαιόλουτρο με μαγνητική ανάδευση στους 70°C έως ότου το μίγμα γίνει ένα ομοιογενές και διαυγές ρευστό, δηλαδή για περίπου 60min. Έπειτα, το NADES Sodium Acetate-Gly 1:9 μεταγγίζεται σε γυάλινο φιαλίδιο και αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου.

Πίνακας 8: Συστατικά, χημική δομή και μοριακή αναλογία των NADES

NaDES	Συστατικό 1	Συστατικό 2	Συστατικό 3	Μοριακή αναλογία
Bet-Gly	 Betaine (HBA)	 Glycerol (HBD)	-	1:2
Bet-Gly-W	 Betaine (HBA)	 Glycerol (HBD)	 Water	1:2:1
ChCl-Gly	 Choline Chloride (HBA)	 Glycerol (HBD)	-	1:2
ChCl-Gly-W	 Choline Chloride (HBA)	 Glycerol (HBD)	 Water	1:2:1
Pro-Gly	 L-proline (HBA)	 Glycerol (HBD)	-	1:2

<b>Sodium Acetate-Gly</b>	 Sodium acetate (HBA)	 Glycerol (HBD)	-	1:9
---------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------	---	-----

## 2.3. Χαρακτηρισμός NADES

### 2.3.1 Μέτρηση pH

Με τη βοήθεια ηλεκτρονικού πεχαμέτρου μετράται το pH των NADES σε θερμοκρασία περιβάλλοντος καθώς και το pH του NADES ChCl-Gly-W 1:2:1, διάφορες αραιώσεις με συνδιαλύτη το νερό προς σχηματισμό της χαρακτηριστικής καμπύλης που υποδεικνύεται η συσχέτιση pH-συγκέντρωσης NADES σε νερό.

### 2.3.2 Μέτρηση πολικότητας

Η πολικότητα των NADES υπολογίζεται χρησιμοποιώντας τον δείκτη Ερυθρό του Νείλου (Nile Red) ως διαλυτοχρωμικό ανιχνευτή. Το διάλυμα Nile Red παρασκευάστηκε με διάλυση 1 g/L του Nile Red σε αιθανόλη.<sup>[26]</sup>

Αρχικά, μετράται η πολικότητα της αιθανόλης ως δαλύτης αναφοράς, διαλύοντας σε 960μL αυτής 40μL Nile Red. Έπειτα, για τη μέτρηση της πολικότητας των NADES, αρχικά, προστίθεται κατάλληλη ποσότητα του NADES (περίπου 2 ml) σε κυψελίδα 1 cm<sup>2</sup> και πραγματοποιείται φωτομέτρηση με φασματοφωτόμετρο υπεριώδους-ορατού UV-Vis στην περιοχή των 400-700 nm (τυφλό δείγμα). Στη συνέχεια, προστέθηκε στο διαλύτη κατάλληλη ποσότητα του διαλύματος Nile red (30-70 μL) και έπειτα από πολύ καλή ανάδευση του συστήματος και ομογενοποίησής του, προσδιορίζεται η μέγιστη απορρόφηση του ( $\lambda_{max}$ ) στην περιοχή 400-700 nm.<sup>[26]</sup>

Η ενέργεια μοριακής μετάβασης  $E_{NR}$  υπολογίζεται χρησιμοποιώντας την ακόλουθη εξίσωση (εξίσωση 2)<sup>[26]</sup>:

$$E_{NR} (kcal \cdot mol^{-1}) = \frac{28591}{\lambda_{max}} \quad (2)$$

Το κόκκινο του Νείλου παρουσιάζει μια βαθυχρωμική μετατόπιση στους πολικούς διαλύτες και μια υψοχρωματική μετατόπιση σε μη πολικούς διαλύτες. Οι υψηλες τιμές  $E_{NR}$  υποδεικνύουν χαμηλότερη πολικότητα των ελεγχόμενων διαλυτών ενώ οι χαμηλές τιμές  $E_{NR}$  υποδηλώνουν υψηλότερη πολικότητα στην κλίμακα πολικότητας του Ερυθρού του Νείλου.<sup>[26] [27]</sup>

### 2.3.3 Φασματοσκοπία υπερύθρου FT-IR (ATR)

Η φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier και τεχνική εξασθενημένης ολικής ανάκλασης (ATR) έχει ως στόχο τον δομικό χαρακτηρισμό των διαλυτών και τη σύγκριση των φασμάτων τους με εκείνα των φιλμ. Για κάθε NADES, μία σταγόνα τοποθετείτε στον υποδοχέα δείγματος του φασματογράφου έτσι ώστε με χρήση της πρέσας του, το δείγμα να ακτινοβοληθεί στο εύρος 4000-400 cm<sup>-1</sup> (μέσο υπέρυθρο).

## 2.4. Μελέτη διαλυτότητας καζεΐνης στους NADES

### 2.4.1 Δοκιμές διάλυσης καζεΐνης

Για την μελέτη διαλυτότητας της καζεΐνης στους NADES που συντέθηκαν, παρασκευάζονται μίγματα καζεΐνης διαφορετικών συγκεντρώσεων σε νερό και NADES τα οποία αναδεύονται σε vortex με στόχο την διάλυση της πρωτεΐνης. Όπου κρίθηκε απαραίτητο, καθώς η διάλυση της καζεΐνης δεν ήταν επιτυχής, εφαρμόστηκε θέρμανση, υπέρηχοι ή προστέθηκαν σταγόνες NaOH 1M. Όλες οι προσπάθειες παρουσιάζονται συνοπτικά στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 9: Δοκιμές διάλυσης της καζεΐνης σε διάφορους διαλύτες

Διαλύτης	Συγκέντρωση καζεΐνης (w/w)	Θέρμανση	Υπέρηχοι	διάλυμα NaOH 1M
Νερό	0,7 %	OXI / 60°C	-	-
Νερό	0,7 %	-	-	5 σταγόνες
16,7% w/w ChCl-Gly 1:2	0,6 %	OXI / 60°C	-	-
25% w/w ChCl-Gly-W 1:2:1	0,6 %	OXI / 60°C	-	-
48% w/w ChCl-Gly-W 1:2:1	0,6 %	OXI / 60°C	-	-
Bet-Gly 1:2	0,7 %	OXI / 60°C	-	-
Chcl-Gly 1:2	0,7 %	-	-	-
Chcl-Gly 1:2	0,35 %	-	-	-
ChCl-Gly-W 1:2:1	0,7 %	OXI / 60°C	-	-
Bet-Gly-W 1:2:1	20,0 %	100°C	-	-
Bet-Gly-W 1:2:1	33,3 %	100°C	-	-
Bet-Gly-W 1:2:1	50,0 %	-	100 watt, 11'	-
Bet-Gly-W 1:2:1	33,3 %	-	100 watt, 11'	-
50% w/w Bet-Gly-W 1:2:1	33,3 %	-	100 watt, 10'	-
Bet-Gly 1:2	0,7 %	60°C	-	3 σταγόνες
Bet-Gly-W 1:2:1	0,7 %	60°C	-	3 σταγόνες
Chcl-Gly 1:2	0,7 %	60°C	-	3 σταγόνες
ChCl-Gly-W 1:2:1	0,7 %	60°C	-	3 σταγόνες

### 2.4.2 Καμπύλη καζεΐνης

Για το σχηματισμό καμπύλης αναφοράς της καζεΐνης παρασκευάζονται διαλύματα καζεΐνης σε απιονισμένο νερό με συγκέντρωση NaOH 0,02M σε διάφορες συγκεντρώσεις καζεΐνης. Αρχικά διαλύονται 125mg καζεΐνης σε 100mL υδατικού διαλύματος NaOH 0,02M. Έπειτα, με διαδοχικές αραιώσεις παρασκευάζονται τα διαλύματα συγκεντρώσεων καζεΐνης από 0,05mg/mL έως 12,5mg/mL. Με τυφλό το διάλυμα NaOH 0,02M μετρήθηκαν οι

απορροφήσεις των διαλυμάτων στα 280nm<sup>[30]</sup> σε φασματοφωτόμετρο UV-Vis έτσι ώστε να προκύψουν οι τιμές απορρόφησης της καζεΐνης για τις διάφορες συγκεντρώσεις της.

## 2.5. Σχηματισμός βιοσυμβατών πρωτεϊνικών φιλμ

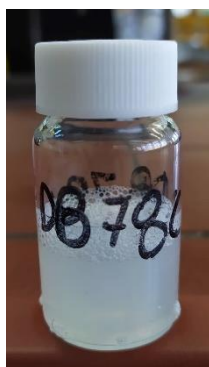
Τα πρωτεϊνικά φιλμ που σχηματίστηκαν και μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία. είχαν ως πρώτη ύλη την καζεΐνη και τις απομονωμένες πρωτεΐνες ορού γάλακτος (WPI) και ως πλαστικοποιητές τους φυσικούς βαθέως ευτηκτικούς διαλύτες (NADES). Επιπλέον, διερευνήθηκε η παρασκευή φιλμ με χρήση τόσο των φυσικών μιγμάτων των αρχικών συστατικών των επιλεγμένων NADES (πριν σχηματιστεί ο διαλύτης) καθώς και ενός εκχυλίσματος που προήλθε από εκχύλιση βιοδραστικών συστατικών από το χαμομήλι με χρήση ενός NADES ως εκχυλιστικό μέσο. Ο τρόπος παρασκευής των πρωτεϊνικών φιλμ περιγράφεται αναλυτικά για κάθε περίπτωση στη συνέχεια.

### 2.5.1 Γενική μέθοδος παρασκευής φιλμ καζεΐνης

Για τον σχηματισμό φιλμ καζεΐνης με χρήση NADES, αρχικά ζυγίζονται 400mg καζεΐνης για περιεκτικότητα υδατικού διαλύματος 5% w/v και προστέθηκε σε 8mL θερμού απιονισμένου νερού.<sup>[28]</sup> Για την θέρμανση του νερού χρησιμοποιήθηκε υδατόλουτρο στους 40°C και για την ανάδευση του διαλύματος vortex. Για την διάλυση της καζεΐνης προστέθηκε διάλυμα NaOH 1 M με σταγονόμετρο, σε τελική περιεκτικότητα περίπου 3.6% v/v στο διάλυμα καζεΐνης. Το pH μετρήθηκε με ηλεκτρονικό πεχάμετρο πριν και μετά την προσθήκη NaOH και βρέθηκε να κυμαίνεται μεταξύ pH 6.9-7.1 και σε 10.0-11.0 αντιστοίχως. Έπειτα, ακολούθησε θέρμανση του διαλύματος σε υδατόλουτρο στους 60°C για 20-30 min.

Στη συνέχεια, προστέθηκε ο NADES ως πλαστικοποιητής στην κατάλληλη αναλογία (από 75% καζεΐνη- 25% DES μέχρι 25% καζεΐνη έως 75% DES) και η θέρμανση συνεχίστηκε για άλλα 5-10 min. Το πρωτεϊνικό διάλυμα φαίνεται στην Εικόνα 1.

Ακολούθησε ψύξη του διαλύματος στους 40°C στο υδατόλουτρο και έπειτα μεταγγίστηκε σε προζυγισμένο κρυσταλλωτήριο (Εικόνα 2) εσωτερικής διαμέτρου 5,6 cm

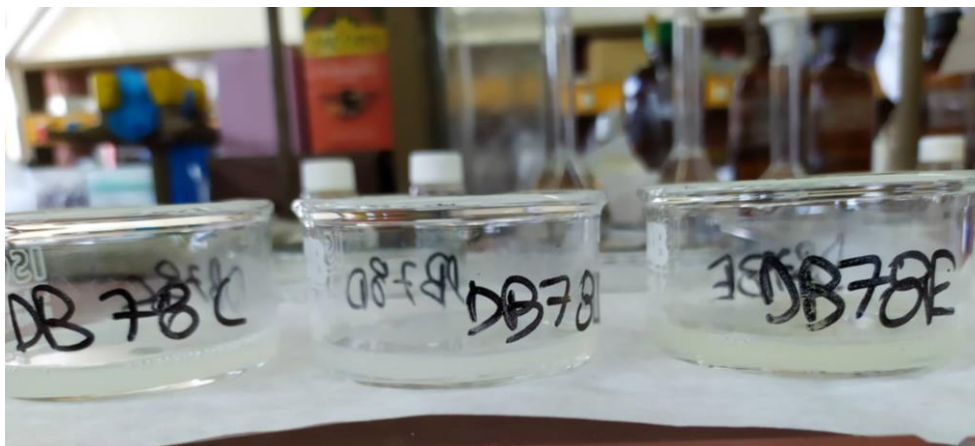


Εικόνα 1: Το διάλυμα προς σχηματισμό film πριν τη μετάγγιση του σε κρυσταλλωτήριο

(A=25cm<sup>2</sup>) για να τοποθετηθεί στο φούρνο για ξήρανση στους 40-50°C (Εικόνα 3).<sup>[28]</sup> Η ξήρανση διήρκεσε 2 ή 3 ημέρες (αναλόγως το σύστημα) μέχρι να εξατμιστεί όλο το περιεχόμενο νερό. Μετά την πλήρη εξάτμιση του νερού, το φιλμ που έχει δημιουργηθεί αποκολλήθηκε από το κρυσταλλωτήριο με χρήση σπαθίδας ή λαβίδας και αποθηκεύτηκε σε ξηραντήρα.



Με την ίδια ακριβώς διαδικασία πραγματοποιήθηκαν επαναλήψεις σε διαφορετικές διαμέτρους κρυσταλλωτηρίων -  $d = 2.8\text{cm} / 4.5\text{cm} / 4.8\text{cm} / 6.6\text{cm} / 8.8\text{cm} / 9.0\text{cm} / 9.5\text{cm}$  - με ίδια αναλογία του διαλύματος προς σχηματισμό φιλμ.



Εικόνα 2: Τα διαλύματα προς σχηματισμό film πριν τη μετάγγιση του σε κρυσταλλωτήριο



Εικόνα 3: Τα διαλύματα προς σχηματισμό φιλμ στην έναρξη Ξήρανσης τους στο φούρνο

Στον Πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας 10), παρουσιάζονται οι δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν στην προσπάθεια παρασκευής των φιλμ καζεΐνης καθώς και οι επαναλήψεις τους.

Πίνακας 10 : Δοκιμές παρασκευής φιλμ καζεΐνης με NADES

Κωδικός	NADES	Αναλογία καζεΐνης-DES	Επαναλήψεις
F1	Bet-Gly 1:2	2:1	5
F2	Bet-Gly 1:2	1:1	8
F3	Bet-Gly 1:2	1:2	3
F4	Bet-Gly-W 1:2:1	3:1	1
F5	Bet-Gly-W 1:2:1	2:1	3
F6	Bet-Gly-W 1:2:1	1:1	6
F7	Bet-Gly-W 1:2:1	1:2	1
F8	ChCl-Gly 1:2	3:1	1

<b>F9</b>	ChCl-Gly 1:2	2:1	3
<b>F10</b>	ChCl-Gly 1:2	1:1	1
<b>F11</b>	ChCl-Gly-W 1:2:1	3:1	1
<b>F12</b>	ChCl-Gly-W 1:2:1	2:1	3
<b>F13</b>	ChCl-Gly-W 1:2:1	1:1	1
<b>F14</b>	Pro-Gly 1:2	3:1	1
<b>F15</b>	Pro-Gly 1:2	2:1	1
<b>F16</b>	Pro-Gly 1:2	1:1	4
<b>F17</b>	Pro-Gly 1:2	1:2	4
<b>F18</b>	Sodium Acetate-Gly 1:9	2:1	1
<b>F19</b>	Sodium Acetate-Gly 1:9	1:1	5
<b>F20</b>	Sodium Acetate-Gly 1:9	1:2	1

Τα φιλμ τα οποία δεν σχηματίστηκαν επιτυχώς είχαν μόνο μία επανάληψη. Τα φιλμ που σχηματίστηκαν με μεγαλύτερη επαναληψιμότητα, παρασκευάστηκαν με ακριβώς ίδια διαδικασία με πλαστικοποιητή το φυσικό μίγμα των αντίστοιχων NADES.

Για την παρασκευή των πρωτεϊνικών φιλμ με χρήση φυσικών μιγμάτων ως πλαστικοποιητές, ακολουθείται η ίδια διαδικασία όπως περιγράφηκε παραπάνω με τη διαφορά πως αντί να προστεθεί ο NADES προστέθηκαν ξεχωριστά τα συστατικά του ως μίγμα στην ίδια όμως αναλογία στην οποία περιλαμβάνονται στον NADES.

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε διερεύνηση του σχηματισμού φιλμ καζεΐνης με πλαστικοποιητή ένα NADES-εκχύλισμα χαμομηλιού το οποίο προέκυψε έπειτα από την πράσινη διεργασία εκχύλισης του χαμομηλιού με χρήση του NADES Bet-Gly-W 1:2:1 ως εκχυλιστικό διαλύτη που αναπτύχθηκε στα πλαίσια άλλων ερευνητικών μελετών του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας ΕΜΠ.

Τέλος, ως φιλμ αναφοράς επιλέχθηκε να παρασκευαστεί ένα φιλμ με χρήση γλυκερόλης ως πλαστικοποιητή σε διαφορετικές αναλογίες καθώς η γλυκερόλη αποτελεί έναν από τους πιο γνωστούς πλαστικοποιητές στη βιβλιογραφία για αντίστοιχα πρωτεϊνικά φιλμ. Ακολουθεί ο Πίνακας στον οποίο αναγράφονται όλα τα φιλμ που σχηματίστηκαν με φυσικά μίγματα, γλυκερόλη ή εκχύλισμα (Πίνακας 11).

Πίνακας 11: Δοκιμές παρασκευής φιλμ καζεΐνης με φυσικά μίγματα, εκχύλισμα χαμομηλιού και γλυκερόλη

<b>Κωδικός</b>	<b>Φυσικό μίγμα</b>	<b>Αναλογία καζεΐνης-πλαστικοποιητή</b>	<b>Επαναλήψεις</b>
<b>F21</b>	Bet-Gly 1:2	1:1	3
<b>F22</b>	Bet-Gly-W 1:2:1	1:1	3
<b>F23</b>	Sodium Acetate-Gly 1:9	1:1	3
<b>F24</b>	Pro-Gly 1:2	1:1	4
<b>F25</b>	Pro-Gly 1:2	1:2	4
<b>Κωδικός</b>	<b>Εκχύλισμα</b>	<b>Αναλογία καζεΐνης-πλαστικοποιητή</b>	<b>Επαναλήψεις</b>
<b>F26</b>	Χαμομηλιού Bet-Gly-W 1:2:1	1:1	2

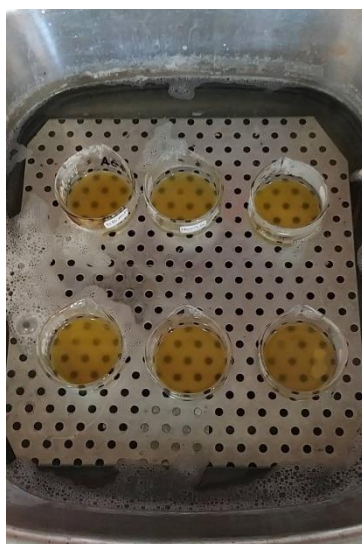
Κωδικός	Reference	Αναλογία καζεΐνης-πλαστικοποιητή	Επαναλήψεις
F27	Glycerol	2:1	2
F28	Glycerol	1:1	1
F29	Glycerol	1:2	1

## 2.5.2 Γενική μέθοδος παρασκευής φιλμ πρωτεϊνών ορού γάλακτος

Για τον σχηματισμό φιλμ πρωτεϊνών ορού γάλακτος με NADES, αρχικά ζυγίζεται ποσότητα Whey Protein Isolate 94% 400mg για περιεκτικότητα υδατικού διαλύματος 5% w/v και προστίθενται σε 8mL θερμού απιονισμένου νερού. Για την θέρμανση του νερού χρησιμοποιήθηκε υδατόλουτρο στους 40° C και για την ανάδευση του διαλύματος vortex. Για την μετουσίωση των πρωτεϊνών πρέπει το pH να απομακρυνθεί από το ισοηλεκτρικό τους σημείο 4,6.<sup>[29]</sup> Γι' αυτό προστέθηκε διάλυμα NaOH 1 M 400μL σε τελική περιεκτικότητα περίπου 5.0% v/v στο διάλυμα πρωτεϊνών. Το pH μετρήθηκε με ηλεκτρονικό πεχάμετρο πριν και μετά την προσθήκη NaOH και βρέθηκε να κυμαίνεται μεταξύ pH 6.4-6.6 και σε 10.8-11.7 αντιστοίχως. Έπειτα, ακολούθησε θέρμανση του διαλύματος σε υδατόλουτρο στους 85°C για 20 min.

Στη συνέχεια, προστέθηκε ο NADES ως πλαστικοποιητής στην κατάλληλη αναλογία (από 60% καζεΐνη- 40% DES μέχρι 33% καζεΐνη έως 67% DES) και η θέρμανση συνεχίστηκε για άλλα 10 min.

Ακολούθησε ψύξη του διαλύματος στους 40°C στο υδατόλουτρο και έπειτα μεταγγίστηκε σε προζυγισμένο κρυσταλλωτήριο εσωτερικής διαμέτρου 5,6cm (A=25cm<sup>2</sup>) για να τοποθετηθεί ξανά στο υδατόλουτρο για ξήρανση στους 40° C (Εικόνα 4).



Εικόνα 4: Τα διαλύματα προς σχηματισμό φιλμ στην έναρξη ξήρανσης τους στο υδατόλουτρο (40° C)

Η ξήρανση διήρκεσε 1 ημέρα μέχρι εξατμιστεί όλο το περιεχόμενο νερό κι έπειτα ακολούθησε παραμονή σε φούρνο θερμοκρασίας 40°C για 2 ώρες και τα φιλμ έλαβαν την μορφή που φαίνεται στην Εικόνα 5.<sup>[29]</sup> Μετά την πλήρη εξάτμιση του νερού, το φιλμ που έχει δημιουργηθεί αποκολλήθηκε από το κρυσταλλωτήριο με χρήση σπαθίδας ή λαβίδας και αποθηκεύτηκε σε ξηραντήρα.

Με την ίδια ακριβώς διαδικασία πραγματοποιήθηκαν επαναλήψεις σε διαφορετικές διαμέτρους -d= 6.6cm / 9.0cm / 9.5cm- κρυσταλλωτήριων με ίδια αναλογία του διαλύματος προς σχηματισμό φιλμ.



Εικόνα 5: Τα φιλμ που σχηματίστηκαν στα κρυσταλλωτήρια μετά την εξάτμιση

Επιπλέον, ως φιλμ αναφοράς επιλέχθηκε να παρασκευαστεί ένα φιλμ με χρήση γλυκερόλης ως πλαστικοποιητή σε διαφορετικές αναλογίες πρωτεΐνης/πλαστικοποιητή καθώς είναι ένας από τους πιο γνωστούς πλαστικοποιητές στη βιβλιογραφία για αντίστοιχα πρωτεϊνικά φιλμ.

Στον Πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας 12), παρουσιάζονται οι δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν στην προσπάθεια παρασκευής των φιλμ WPI καθώς και οι επαναλήψεις τους.

Πίνακας 12 : Δοκιμές παρασκευής φιλμ WPI με NADES και γλυκερόλη

Κωδικός	NADES	Αναλογία WPI-DES	Επαναλήψεις
F30	Bet-Gly 1:2	1:1	12
F31	Bet-Gly 1:2	1.4:1	1
F32	Bet-Gly 1:2	1:1.5	1
F33	Bet-Gly-W 1:2:1	1:1	11
F34	Bet-Gly-W 1:2:1	1.4:1	2
F35	Sodium Acetate-Gly 1:9	1:1	2
F36	Sodium Acetate-Gly 1:9	1.3:1	1
F37	Pro-Gly 1:2	1.4:1	1
F38	Pro-Gly 1:2	1:1	12
F39	Pro-Gly 1:2	1:2	1
Κωδικός	Reference	Αναλογία WPI-Gly	Επαναλήψεις
F40	Glycerol	1:1	2

## 2.6. Χαρακτηρισμός φιλμ

### 2.6.1 Μέτρηση μάζας

Σε ζυγό ακριβείας 4 δεκαδικών ψηφίων προζυγίστηκε κάθε κρυσταλλωτήριο πριν την παρασκευή κάθε φιλμ ( $m_{\text{κρυστ}}$ ). Μετά το τέλος της ξήρανσης, το κρυσταλλωτήριο εντός του οποίου περιέχεται το σχηματισμένο φιλμ ζυγίστηκε ξανά ( $m_{\text{κρυστ+φιλμ}}$ ). Τελικά η μάζα του φιλμ,  $m_{\text{φιλμ}}$ , υπολογίζεται από τη σχέση:

$$m_{\text{φιλμ}} = m_{\text{κρυστ+φιλμ}} - m_{\text{κρυστ}} \quad (3)$$

### 2.6.2 Μέτρηση πάχους

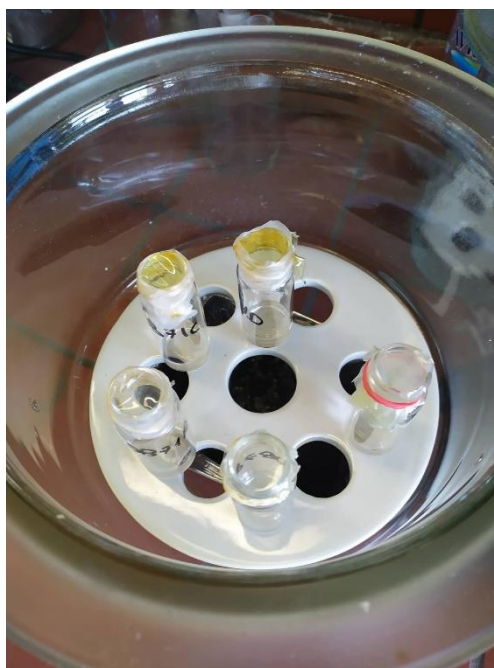
Το πάχος των φιλμ μετρήθηκε με ψηφιακό παχύμετρο (Hogotex 0-25mm). Για κάθε φιλμ λήφθηκαν μετρήσεις σε 5 διαφορετικά σημεία για εγκυρότερο αποτέλεσμα χωρίς σφάλμα τοπικής ανομοιογένειας πάχους. Το πάχος αποτελεί το μέσο όρο των 5 μετρήσεων για κάθε φιλμ.

### 2.6.3 Μέτρηση διαπερατότητας υδρατμών

Η διαπερατότητα υδρατμών, Water Vapor Permeability (WVP), υπολογίστηκε ακολουθώντας την Πρότυπη Μέθοδο για τη μεταφορά υδρατμών από υλικά, την ASTM 2016 (Standard Test Method for Water Vapor Transmission of Materials) <sup>[23]</sup>. Κάθε φιλμ σφράγισε (με επιπλέον parafilm και λαστιχάκι) την κορυφή ενός vial με εμβαδόν στο άνοιγμα 6,15 cm<sup>2</sup> που περιέχει 3,5 mL απιονισμένο νερό (RH=100%) έτσι ώστε να το νερό που εξατμίζεται να διέρχεται μόνο μέσω του φιλμ. Το σύστημα τοποθετήθηκε σε ξηραντήρα ισορροπημένο σε RH=0 όπως φαίνεται στην Εικόνα 6. Το σύστημα vial-νερό-φιλμ ζυγίστηκε τη χρονική στιγμή  $t=0$  και η απώλεια μάζας του συστήματος καταγράφηκε περιοδικά σε διάστημα 24 ωρών. Η WVP υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας την ακόλουθη εξίσωση:

$$WVP = \left(\frac{g}{tA}\right) \cdot \left(\frac{x}{\Delta P}\right) \quad \left(\frac{g}{s \cdot m \cdot Pa}\right) \quad (4)$$

Όπου  $g/t$  είναι η κλίση της μάζας σε σχέση με το χρόνο (g/s),  $A$  είναι η ανοιχτή επιφάνεια σε m<sup>2</sup>,  $x$  είναι το πάχος του φιλμ (m) και  $\Delta P$  η μερική πίεση ατμών (2338.8 Pa στους 20°C)<sup>[23]</sup>.



Εικόνα 6: Δείγματα εντός ξηραντήρα κατά τη μέτρηση διαπερατότητας υδρατμών

#### 2.6.4 Μέτρηση διαλυτότητας

Η διαλυτότητα του φιλμ στο νερό (Water Solubility) μετρήθηκε με βάση τη μεθοδολογία που ακολούθησαν οι Pereira, Andrade (2017) <sup>[22]</sup>. Πιο συγκεκριμένα:

##### Φιλμ καζεΐνης

Ενδεικτικά, ένα φιλμ καζεΐνης με NADES Bet-Gly-W 1:2:1 (*F30*) κόβεται σε στρογγυλό κομμάτι με επιφάνεια  $6,15 \text{ cm}^2$ . Ξηραίνεται σε φούρνο στους  $100^\circ\text{C}$  για 24h και ζυγίζεται για να μετρηθεί η αρχική ξηρή μάζα ( $M_i$ ). Έπειτα, εμβαπτίζεται σε 77mL απιονισμένου νερού σε θερμοκρασία δωματίου με περιοδική ανάδευση σε ανακινητήρα (80rpm) για 24h. Τελικά, το δείγματα αφαιρείται από το νερό, ξηραίνεται στους  $100^\circ\text{C}$  για 24h και ζυγίζεται για να μετρηθεί η τελική μάζα ( $M_f$ ). Η διαλυτότητα στο νερό υπολογίζεται από την παρακάτω σχέση<sup>[22]</sup>:

$$WS(\%) = \frac{M_i - M_f}{M_i} \cdot 100 \quad (5)$$

##### Φιλμ WPI

Για την μέτρηση διαλυτότητας σε φιλμ WPI, επιλέχθηκε ενδεικτικά το φιλμ WPI με NADES Bet-Gly 1:2 (*F30*) και κόβεται σε τετράγωνο με επιφάνεια  $4 \text{ cm}^2$ . Ξηραίνεται σε φούρνο στους  $100^\circ\text{C}$  για 24h και ζυγίζεται για να μετρηθεί η αρχική ξηρή μάζα ( $M_i$ ). Έπειτα, εμβαπτίζεται σε 50mL απιονισμένου νερού σε θερμοκρασία δωματίου με περιοδική ανάδευση σε ανακινητήρα (80rpm) για 24h. Τελικά, το δείγματα αφαιρείται από το νερό, ξηραίνεται στους  $100^\circ\text{C}$  για 24h και ζυγίζεται για να μετρηθεί η τελική μάζα ( $M_f$ ). Η διαλυτότητα υπολογίστηκε ξανά από τη σχέση (5).

## 2.6.5 Φασματοσκοπία υπερύθρου FT-IR (ATR)

Η φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier και τεχνική εξασθενημένης ολικής ανάκλασης (ATR) έχει ως στόχο τον δομικό χαρακτηρισμό των φιλμ και τα φάσματα FT-IR των φιλμ μετρήθηκαν χρησιμοποιώντας ένα Bruker ALPHA II. Για κάθε φιλμ, ένα μικρό κομμάτι (περίπου 1 cm<sup>2</sup>) τοποθετείται στον υποδοχέα δείγματος ώστε να έρθει σε επαφή με τον κρύσταλλο του φασματογράφου και με χρήση της πρέσας του, το δείγμα να ακτινοβοληθεί στο εύρος 4000-400 cm<sup>-1</sup> (μέσο υπέρυθρο).

## 2.6.6 Ανάλυση υφής

Η ανάλυση υφής (Texture Profile Analysis, TPA) είναι μια μέθοδος μέτρησης μηχανικών ιδιοτήτων των τροφίμων. Το όργανο που χρησιμοποιήθηκε είναι ο TA.XT2i (Stable Micro System) με αισθητήρα διείσδυσης (penetration probe) από ανοξείδωτο χάλυβα και αναλύθηκε με το λογισμικό Texture Exponent 32. Η αλληλεπίδραση του στελέχους με το τρόφιμο μετριέται ως δύναμη σε συνάρτηση με το χρόνο. Κάθε φιλμ στερεώθηκε σε ένα δακτύλιο στήριξης (supporting rig) και το probe κινήθηκε κατακόρυφα προς το κέντρο της μεμβράνης με ταχύτητα 1 mm s<sup>-1</sup>.<sup>[23]</sup> Για την μέτρηση διαφορετικών ιδιοτήτων υφής πραγματοποιήθηκαν μια δοκιμή θραύσης και μια δοκιμή συμπίεσης για κάθε είδος φιλμ με δύο-τρεις επαναλήψεις.

### Δοκιμή θραύσης

Για την δοκιμή θραύσης στον αναλυτή υφής ρυθμίστηκαν οι παρακάτω παράμετροι:

Πίνακας 13: Ρυθμίσεις αναλυτή υφής για δοκιμή θραύσης

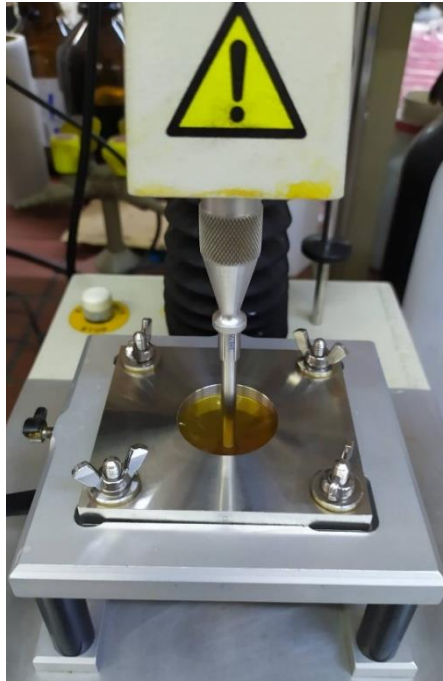
Texture Analysis Settings		
Pre-Test Speed	5	mm/sec
Test Speed	1	mm/sec
Post-Test Speed	2	mm/sec
Distance	<b>20</b>	mm
Count (κύκλος συμπίεσης)	1	

Το probe που χρησιμοποιήθηκε είναι λεπτό κυλινδρικό και φαίνεται στην παρακάτω εικόνα.



Εικόνα 7: Probe (αισθητήρας διείσδυσης) αναλυτή υφής κατά την δοκιμή θραύσης

Το probe μετακινήθηκε κατακόρυφα στο φιλμ μέχρι να το σπάσει. Έτσι μετρήθηκαν η δύναμη που απαιτείται για τη θραύση της μεμβράνης (Burst Strength) ή αλλιώς σκληρότητα και η συνολική επιμήκυνση της μεμβράνης πριν τη θραύση (Distance at Burst) ή αλλιώς ευθραυστότητα από το διάγραμμα δύναμης-χρόνου.



Εικόνα 8: Δοκιμή θραύσης σε WPI film

#### Δοκιμή συμπίεσης

Για την δοκιμή συμπίεσης στον αναλυτή υφής ρυθμίστηκαν οι παρακάτω παράμετροι:

Πίνακας 14: Ρυθμίσεις αναλυτή υφής για δοκιμή συμπίεσης

<b>Texture Analysis Settings</b>		
Pre-Test Speed	5	mm/sec
Test Speed	1	mm/sec
Post-Test Speed	2	mm/sec
Distance	5	mm
Count (κύκλοι συμπίεσης)	2	

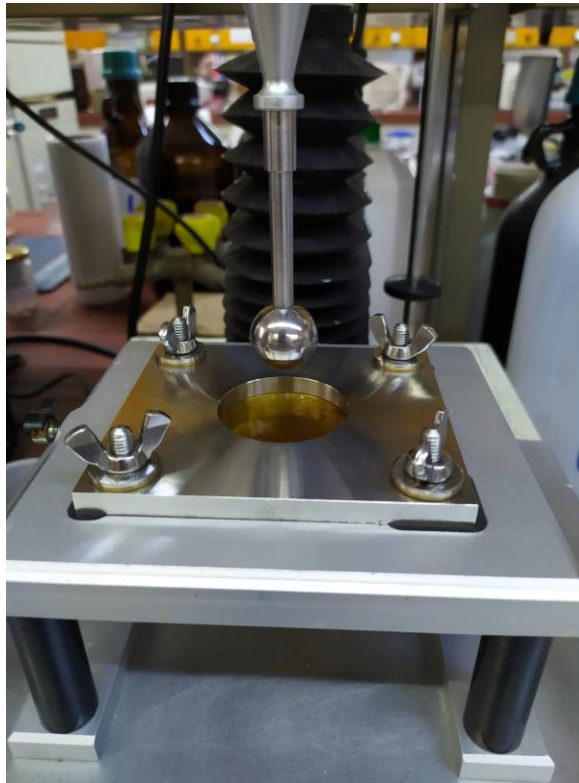


Το probe που χρησιμοποιήθηκε είναι λεπτό σφαιρικό και φαίνεται στην παρακάτω εικόνα.



*Εικόνα 9: Probe (αισθητήρας δειξίδυσης) αναλυτή υφής κατά την δοκιμή συμπίεσης*

Από το διάγραμμα δύναμης-χρόνου κατά την δοκιμή συμπίεσης μπορούν να υπολογιστούν η συνεκτικότητα, η ελαστικότητα, η ανθεκτικότητα και η προσκολλησιμότητα για κάθε φιλμ.

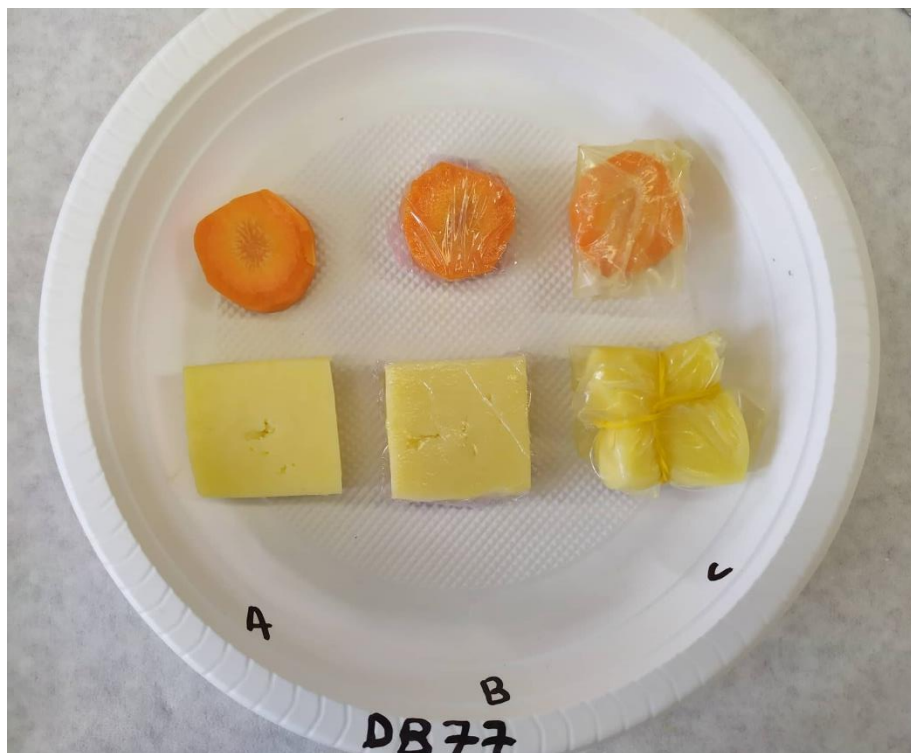


*Εικόνα 10: Δοκιμή συμπίεσης σε WPI film*

## 2.7 Προκαταρκτική μελέτη εφαρμογής χρήσης φιλμ για επικάλυψη τροφίμου

Ένας σημαντικός παράγοντας που είναι απαραίτητος για τη διατήρηση της ποιότητας των τροφίμων, είναι η αποφυγή απώλειας νερού. Η υγρασία χάνεται κατά τη διάρκεια της διαπνοής όταν μετατρέπεται το νερό από υγρό σε αέριο και τα φιλμ μπορούν να σχεδιαστούν ώστε να μειώσουν την απώλεια νερού. Με δεδομένο ότι η κύρια εφαρμογή των πρωτεϊνικών φιλμ είναι η επικάλυψη τροφίμων, έγινε προκαταρκτική εφαρμογή των φιλμ σε καρότα και τυρί τύπου GOUDA (NOYNOY).

Κατά την πρώτη εφαρμογή και με στόχο την σύγκριση της αποτελεσματικότητας της μεμβράνης το καρότο και το τυρί τεμαχίστηκαν σε 3 όμοια κομμάτια και χωρίστηκαν σε δείγματα Α,Β,Σ. Τα δείγματα Α παρέμειναν χωρίς επικάλυψη, τα δείγματα Β επικαλύφθηκαν με εμπορική πλαστική μεμβράνη περιτυλίγματος τροφίμων και τα δείγματα Σ επικαλύφθηκαν με φιλμ καζεΐνης με NADES Bet-Gly 1:2 (F2) όπως φαίνεται στην Εικόνα 11. Το συγκεκριμένο φιλμ επιλέχθηκε για δοκιμή επικάλυψης τροφίμου καθώς είχε ικανοποιητική σκληρότητα και τα χαρακτηριστικά του έτειναν προς τη συμβατική πλαστική μεμβράνη περιτυλίγματος. Στη περίπτωση του δείγματος τυριού με επικάλυψη μεμβράνης καζεΐνης λόγω της μικρής προσκολλησιμότητας της στο τρόφιμο, κρίθηκε απαραίτητη η υποβοήθηση τους για αποτελεσματικότερο σφράγισμα με χρήση εξωτερικών μέσων (Εικόνα 11). Τα δείγματα προγουζίστηκαν και παρέμειναν σε ανοιχτό περιβάλλον και θερμοκρασία περιβάλλοντος 25°C για μία εβδομάδα και παρατηρήθηκε η οπτική τους αλλοίωση και η απώλεια μάζας τους μέσω καθημερινών ζυγίσεων.

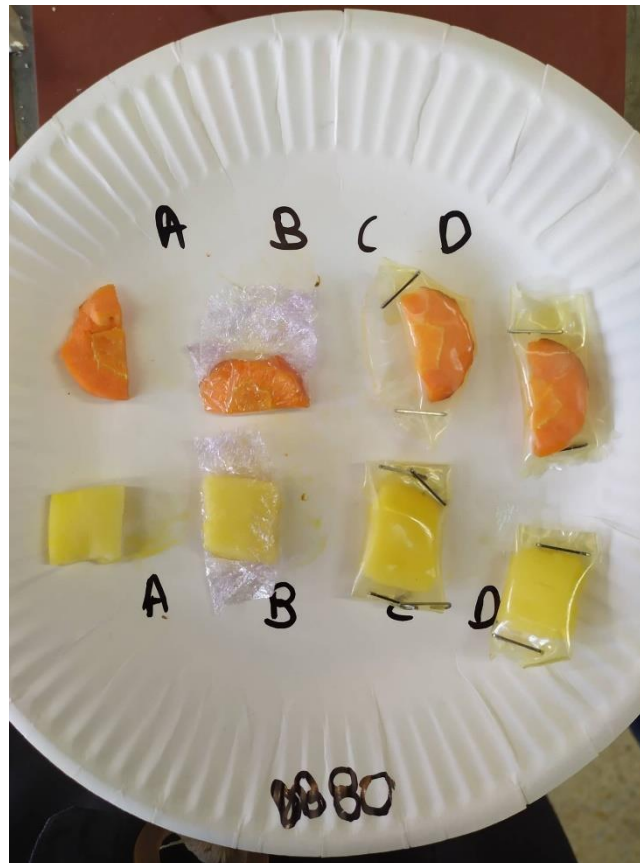


Εικόνα 11: Πρώτη μέρα εφαρμογής  
Α: Δείγμα καρότου και τυριού χωρίς επικάλυψη.  
Β: Δείγμα καρότου και τυριού με επικάλυψη πλαστικής μεμβράνης.  
Σ: Δείγμα καρότου και τυριού με φιλμ καζεΐνης με NADES Bet-Gly 1:2 (F2)

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε και δεύτερη μελέτη εφαρμογής των πρωτεϊνικών φιλμ σε δύο διαφορετικά είδη φιλμ: το φιλμ καζεΐνης με πλαστικοποιητή NADES και το φιλμ καζεΐνης με πλαστικοποιητή εκχύλισμα χαμομηλιού με διαλύτη το ίδιο NADES.

Τεμαχίστηκαν 4 όμοια κομμάτια καρότου και τυριού GOUDA (NOYNOY) και χωρίστηκαν σε δείγματα Α,Β,Σ,Δ. Τα δείγματα Α παρέμειναν χωρίς επικάλυψη, τα δείγματα Β επικαλύφθηκαν με εμπορική πλαστική μεμβράνη περιτυλίγματος τροφίμων, τα δείγματα Σ επικαλύφθηκαν με φιλμ καζεΐνης με πλαστικοποιητή εκχύλισμα χαμομηλιού με DES Bet-Gly-W 1:2:1 (F2δ) και τα δείγματα Δ με φιλμ καζεΐνης με DES Bet-Gly-W 1:2:1 (Fδ) όπως φαίνεται στην Εικόνα 12. Τα δείγματα με επικάλυψη μεμβράνης καζεΐνης λόγω της μικρής

προσκολλησιμότητας της στα τρόφιμα, κρίθηκε απαραίτητη η υποβοήθηση τους για αποτελεσματικότερο σφράγισμα με χρήση εξωτερικών μέσων (Εικόνα 12). Τα δείγματα προγυζίστηκαν και παρέμειναν σε ανοιχτό περιβάλλον και θερμοκρασία περιβάλλοντος 30°C για μία εβδομάδα και παρατηρήθηκε η οπτική τους αλλοίωση και η απώλεια μάζας τους μέσω καθημερινών ζυγίσεων.



*Εικόνα 12: Πρώτη μέρα εφαρμογής*

*A: Δείγμα καρότου και τυριού χωρίς επικάλυψη.*

*B: Δείγμα καρότου και τυριού με επικάλυψη πλαστικής μεμβράνης.*

*C: Δείγμα καρότου και τυριού με φιλμ καζεΐνης με πλαστικοποιητή εκχύλισμα χαμομηλιού με NADES Bet-Gly-W 1:2:1 (F26).*

*D: Δείγμα καρότου και τυριού με φιλμ καζεΐνης με NADES Bet-Gly-W 1:2:1 (F6).*

### 3. Αποτελέσματα-Συζήτηση

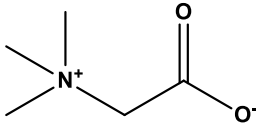
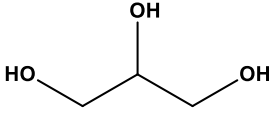
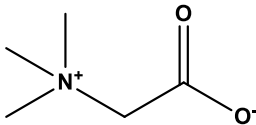
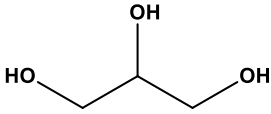
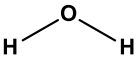
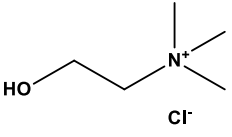
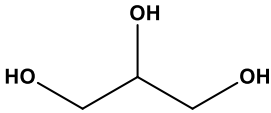
#### 3.1 Σύνθεση NADES

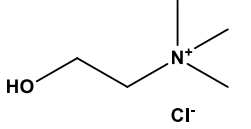
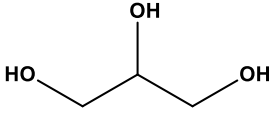
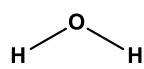
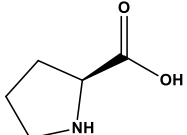
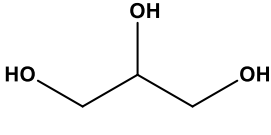
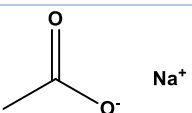
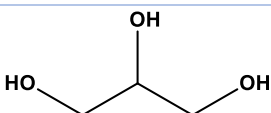
Στον Πίνακα 15 παρουσιάζονται τα συστατικά, η μοριακή τους αναλογία και οι δομές των NADES που σχεδιάστηκαν στοχευμένα και παρασκευάστηκαν για την επιθυμητή εφαρμογή. Η γλυκερόλη επιλέχθηκε ως κοινό συστατικό των NADES που δρα ως δότη δεσμού υδρογόνου. Η γλυκερόλη επιλέχθηκε ως απαραίτητο συστατικό των NADES καθώς είναι υδρόφιλη και από τους πιο συχνά χρησιμοποιούμενους πλαστικοποιητικές για πρωτεϊνικά φιλμ. <sup>[12]</sup> Ακόμα, η γλυκερόλη μπορεί να δημιουργήσει δεσμούς υδρογόνου με υπολείμματα αμινοξέων των πρωτεϊνών που επηρεάζουν την τελική δομή των φιλμ. <sup>[38]</sup>

Η βεταΐνη, η χλωριούχος χολίνη, η προλίνη και το οξικό νάτριο που χρησιμοποιήθηκαν ως δέκτες δεσμού υδρογόνου έχουν χρησιμοποιηθεί ως πρόσθετα τροφίμων και έχουν αναγνωριστεί ως ασφαλή για κατανάλωση (μέχρι ένα επιτρεπόμενο όριο) από την EFSA (European Food Safety Authority). Επιλέχθηκαν να δοκιμαστούν NADES με διαφορετικά δομικά χαρακτηριστικά όπως η δευτεροταγής αμίνη και ο πενταμελής δακτύλιος της προλίνης, η κατιοντική τεταρτοταγής αμίνη της βεταΐνης και της χλωριούχου χολίνης και η ανιοντική καρβοξυλομάδα της βεταΐνης και του οξικού νατρίου προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση τους στις ιδιότητες των φιλμ.

Είναι σημαντικό να αναφερθεί πως σύμφωνα με τη βιβλιογραφική μελέτη που πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, μέχρι στιγμής, έχουν χρησιμοποιηθεί DES ως πλαστικοποιητές στο σχηματισμό πρωτεϊνικών φιλμ <sup>[39]</sup> αλλά δεν έχουν χρησιμοποιηθεί NADES ως πλαστικοποιητές στο σχηματισμό φιλμ με πρώτη ύλη πρωτεΐνες του γάλακτος. Έχει μελετηθεί η χρήση τους στο σχηματισμό άλλων βιοπολυμερικών φιλμ όπως π.χ. χιτοζάνης. <sup>[23][36]</sup>

Πίνακας 15: Συστατικά, χημική δομή και μοριακή αναλογία των NADES

NaDES	Συστατικό 1	Συστατικό 2	Συστατικό 3	Μοριακή αναλογία
Bet-Gly	 Betaine (HBA)	 Glycerol (HBD)	-	1:2
Bet-Gly-W	 Betaine (HBA)	 Glycerol (HBD)	 Water	1:2:1
ChCl-Gly	 Choline Chloride (HBA)	 Glycerol (HBD)	-	1:2

<b>ChCl-Gly-W</b>	 Choline Chloride (HBA)	 Glycerol (HBD)	 Water	1:2:1
<b>Pro-Gly</b>	 L-proline (HBA)	 Glycerol (HBD)	-	1:2
<b>Sodium Acetate-Gly</b>	 Sodium acetate (HBA)	 Glycerol (HBD)	-	1:9

## 3.2 Χαρακτηρισμός NADES

### 3.2.1 Μέτρηση pH

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 16) παρουσιάζονται οι μετρήσεις pH των βαθέως ευτηκτικών διαλυτών. Αρχικά για κάθε NADES μετρήθηκε το pH του καθαρού διαλύτη (100%w/w) και το pH του διαλύτη σε 5% NADES σε απιονισμένο νερό (w/w) επειδή αυτό είναι το σύνηθες ποσοστό του NADES ως πλαστικοποιητή στο πρωτεϊνικό διάλυμα προς σχηματισμό φιλμ.

Πίνακας 16: Αποτελέσματα pH των NADES

NADES	Συγκέντρωση	pH
<b>Bet-Gly 1:2</b>	100%w/w	8.41
	5%w/w	5.10
<b>Bet-Gly-W 1:2:1</b>	100%w/w	9.03
	5%w/w	4.59
<b>ChCl-Gly 1:2</b>	100%w/w	6.65
	5%w/w	-
<b>ChCl-Gly-W 1:2:1</b>	100%w/w	6.15
	5%w/w	3.72
<b>Pro-Gly 1:2</b>	100%w/w	7.25
	5%w/w	7.09
<b>Sodium Acetate-Gly 1:9</b>	5%w/w	7.63

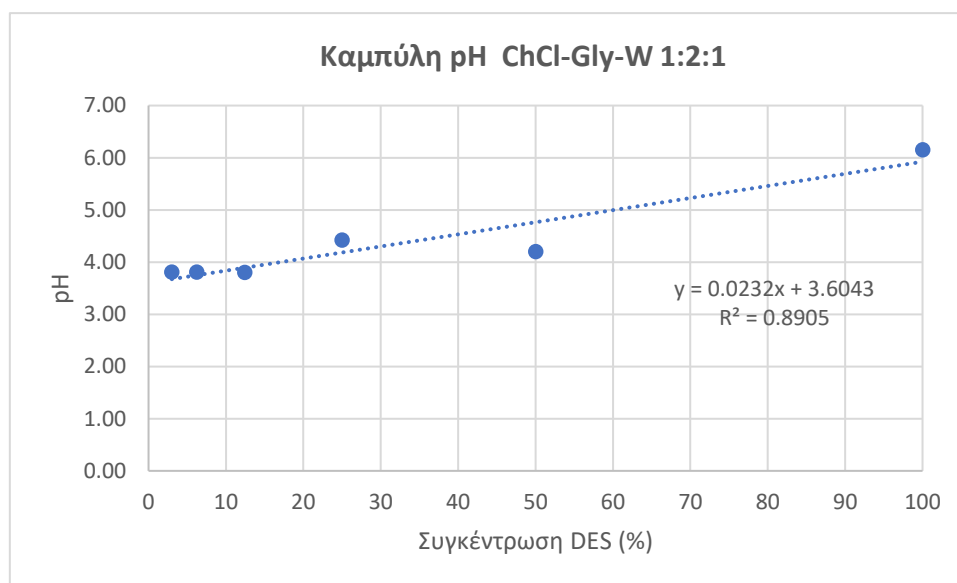
Παρατηρείται ότι οι NaDESs με βεταΐνη έχουν βασικό pH ενώ αυτοί με την χλωριούχο χολίνη έχουν όξινο. Επιπλέον, το NADES Bet-Gly-W 1:2:1 έχει πιο βασικό pH από το Bet-Gly 1:2. Αντιθέτως, η προσθήκη νερού στο NADES ChCl-Gly 1:2, δηλαδή στο ChCl-Gly-W φαίνεται ότι

το σύστημα έχει χαμηλότερο pH. Επιπλέον, παρατηρείται ότι με την αραιώση του NADES σε απιονισμένο νερό το pH μειώνεται περισσότερο από ότι του καθαρού απιονισμένου νερού στα NADES Bet-Gly 1:2, Bet-Gly-W 1:2:1 και ChCl-Gly-W 1:2:1 κι αυτό αποτελεί πιθανή ένδειξη της διάρρηξης του συστήματος του διαλύτη και απελευθέρωσης βεταΐνης ή χλωριούχου χολίνης αντίστοιχα

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 17) καταγράφονται οι τιμές pH του NADES ChCl-Gly-W 1:2:1 κατά τις διαδοχικές του αραιώσεις προς σχηματισμό της χαρακτηριστικής του καμπύλης pH.

Πίνακας 17: Αποτελέσματα μετρήσεων pH του διαλύτη ChCl-Gly-W 1:2:1 για διαφορετικές συγκεντρώσεις σε υδατικό διάλυμα

NADES concentration (%)	pH
100	6.15
50	4.20
25	4.42
12.4	3.80
6.2	3.81
3.0	3.81



Διάγραμμα 2: Καμπύλη pH του NADES ChCl-Gly-W 1:2:1

Από το Διάγραμμα 2 παρατηρείται ότι όσο ο διαλύτης αραιώνεται με νερό το pH μειώνεται έως ότου να σταθεροποιηθεί σε τιμή περίπου 3.8. Με την προσθήκη νερού στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις DES, το pH μειώνεται σε τιμές κάτω από 4, κάτι που ίσως είναι πιθανή ένδειξη της διάρρηξης του συστήματος του διαλύτη και της απελευθέρωσης χλωριούχου χολίνης οδηγώντας σε διάλυμα αυξημένης οξύτητας.

### 3.2.2 Μέτρηση πολικότητας

Στον παρακάτω Πίνακα (Πίνακας 18), παρουσιάζεται η μέγιστη απορρόφηση των NADES όπως καταγράφεται στην περιοχή 400-700 nm έπειτα από την προσθήκη του δείκτη Nile Red καθώς και η ενέργεια μοριακής τους μετάβασης,  $E_{NR}$ , υπολογισμένη με τη σχέση (2).

$$E_{NR} (kcal \cdot mol^{-1}) = \frac{28591}{\lambda_{max}} \quad (2)$$

Πίνακας 18: Υπολογισμός ενέργειας μοριακής μετάβασης των NADES με βάση τη μέγιστη απορρόφηση τους στο ορατό φάσμα

Διαλύτης	$\lambda_{max}$ (nm)	$E_{NR}$ (kcal mol <sup>-1</sup> )
Ethanol	548	52.173
Bet-Gly 1:2	566	50.514
Bet-Gly-W 1:2:1	573	49.897
Sodium Acetate-Gly 1:9	578	49.465
Pro-Gly 1:2	566	50.514
Water <sup>[27]</sup>	593	48.200

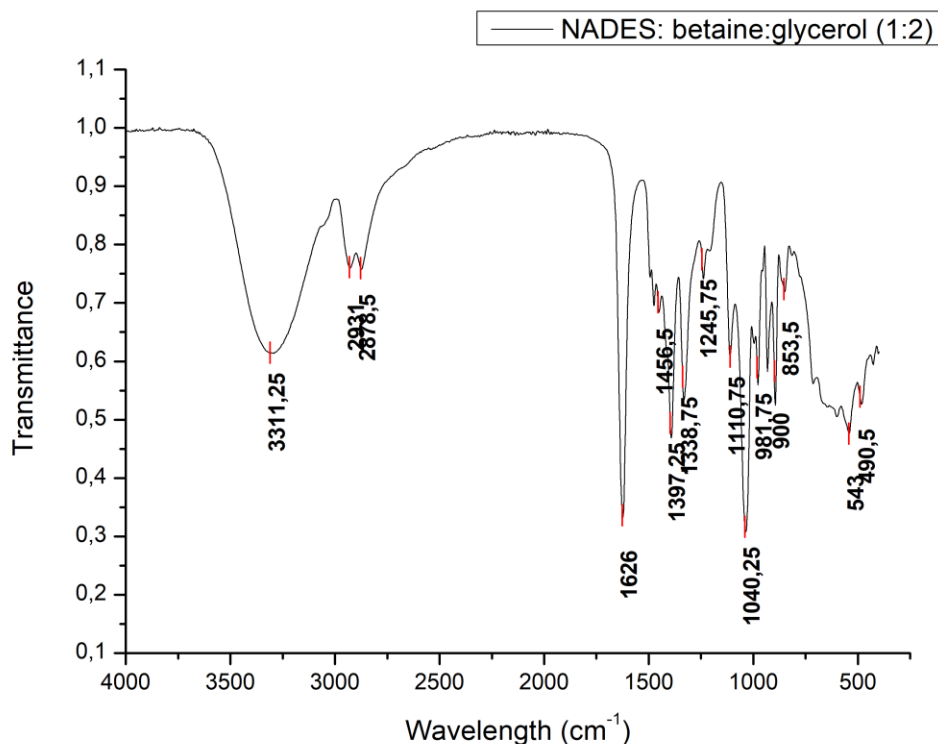
Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία<sup>[27]</sup>, η πολικότητα του νερού έχει υπολογιστεί ως  $E_{NR} = 48.20$  kcal·mol<sup>-1</sup>. Όπως αναφέρθηκε, το Ερυθρό του Νείλου παρουσιάζει μια βαθυχρωμική μετατόπιση στους πολικούς διαλύτες και μια υψοχρωματική μετατόπιση σε μη πολικούς διαλύτες. Οι υψηλές τιμές  $E_{NR}$  υποδεικνύουν χαμηλότερη πολικότητα των ελεγχόμενων διαλυτών ενώ οι χαμηλές τιμές  $E_{NR}$  υποδηλώνουν υψηλότερη πολικότητα στην κλίμακα πολικότητας του Ερυθρού του Νείλου. Επομένως, οι διαλύτες σε σειρά φθίνουσας πολικότητας είναι:

Water > Sodium Acetate-Gly 1:9 > Bet-Gly-W 1:2:1 > Pro-Gly 1:2 / Bet-Gly 1:2 > Ethanol

Παρατηρείται ότι ανάμεσα στα NaDES Bet-Gly-W 1:2:1 και Bet-Gly 1:2 έχει μεγαλύτερη πολικότητα αυτό που έχει ως τρίτο συστατικό το νερό.

### 3.2.3 Φασματοσκοπία υπερύθρου FT-IR (ATR)

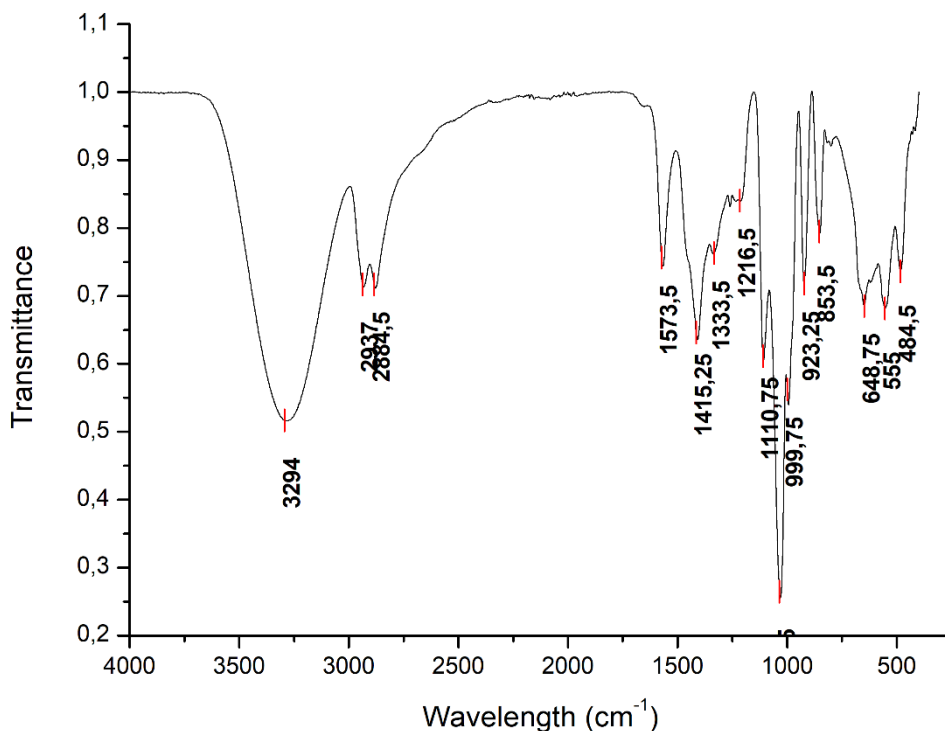
Η φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier και τεχνική εξασθενημένης ολικής ανάκλασης (ATR) έχει ως στόχο τον δομικό χαρακτηρισμό των NADES και τη σύγκριση των φασμάτων τους με εκείνα των πρωτεϊνικών φιλμ όπου οι NADES χρησιμοποιήθηκαν ως πλαστικοποιητές. Έτσι, αναμένεται από αυτή τη μελέτη να παρατηρηθούν οι πιθανές αλληλεπιδράσεις τόσο των συστατικών των NADES όσο και των φιλμ που εμπεριέχουν NADES και οι μεταξύ τους διαφορές. Έτσι, λήφθηκε το φάσμα στο εύρος 4000-400 cm<sup>-1</sup> για τα NADES Betaine-Glycerol 1:2, L-Proline-Glycerol 1:2 και Sodium Acetate-Glycerol 1:9 όπως φαίνονται στα παρακάτω σχήματα.



Σχήμα 6: Φάσμα FTIR (ATR) του NADES Betaine-Glycerol 1:2

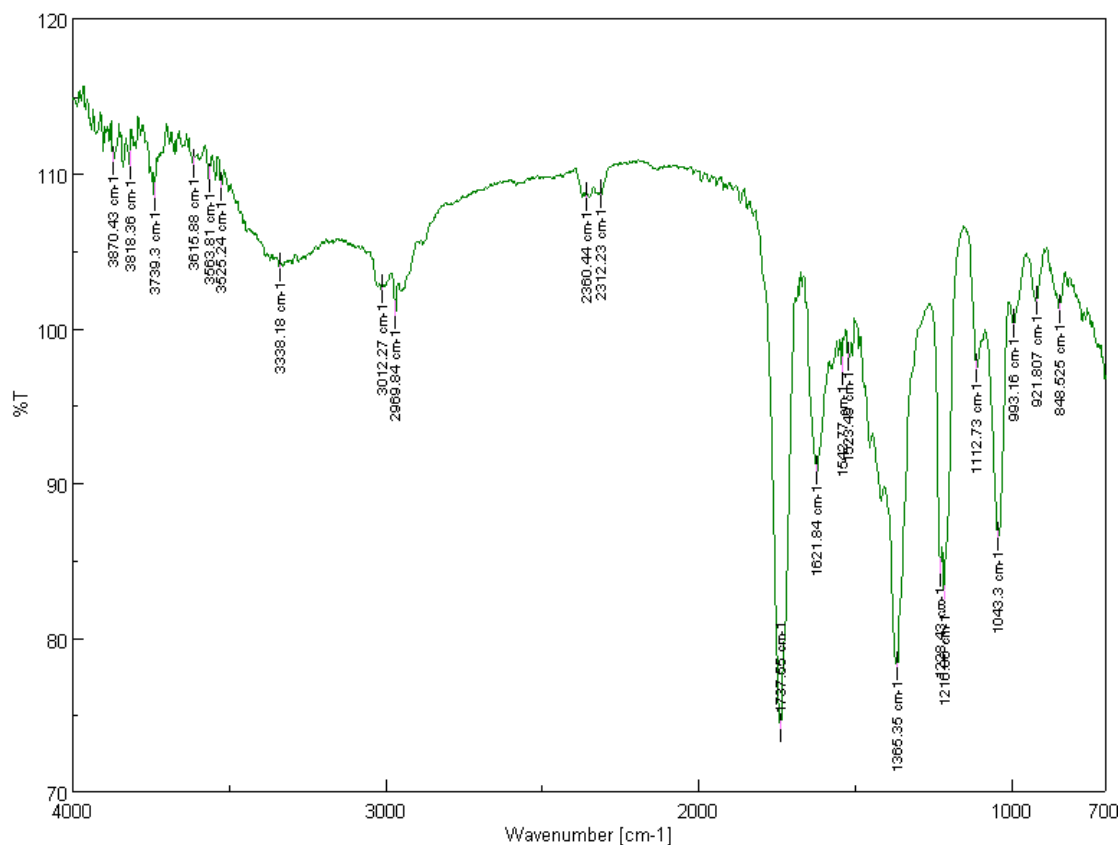
Στο φάσμα FTIR του NADES Bet-Gly 1:2 (Σχήμα 6) αρχικά στο εύρος κυματιριθμών 3100-3500cm<sup>-1</sup> και πιο συγκεκριμένα στα 3311cm<sup>-1</sup>, εμφανίζεται μια ευρεία κορυφή που αποδίδεται σε δόνηση τάσης των υδροξυλομάδων <sup>[23][36]</sup> της γλυκερόλης. Στους 2931cm<sup>-1</sup> και 2879cm<sup>-1</sup> κυματιριθμούς, εμφανίζονται κορυφές που αντιστοιχούν στις ασύμμετρες και συμμετρικές δονήσεις τάσης των δεσμών C-H και -CH<sub>2</sub> αντιστοίχως <sup>[23][36][37]</sup>. Ακόμα, παρατηρείται η δόνηση τάσης του δεσμού C=O του καρβονυλίου της βεταΐνης με ισχυρή κορυφή στους 1626 cm<sup>-1</sup> κυματιριθμούς <sup>[36][37]</sup>. Επιπλέον, οι συμμετρικές δονήσεις τάσης του καρβοξυλικού ιόντος -COO<sup>-</sup> <sup>[23]</sup> της βεταΐνης δίνουν κορυφή στα 1397cm<sup>-1</sup> και η δόνηση τάσης του δεσμού C-N της βεταΐνης δίνει υψηλής έντασης κορυφή στα 1040cm<sup>-1</sup>.





Σχήμα 7: Φάσμα FTIR (ATR) του NADES Sodium Acetate-Glycerol 1:9

Στο φάσμα FTIR του NADES Sodium Acetate-Glycerol 1:9 (Σχήμα 7) αρχικά αποτυπώνεται μια ευρεία κορυφή στους κυματαριθμούς 3100-3500 $\text{cm}^{-1}$  με μέγιστη ένταση περίπου στα 3294 $\text{cm}^{-1}$  που οφείλεται σε δόνηση τάσης των υδροξυλομάδων <sup>[23][36]</sup> της γλυκερόλη. Στη συνέχεια, στους 2937 $\text{cm}^{-1}$  και 2885 $\text{cm}^{-1}$  κυματαριθμούς, αποδίδονται οι ασύμμετρες και οι αντίστοιχες συμμετρικές δονήσεις τάσης των δεσμών C-H και -CH<sub>2</sub><sup>[23][36][37]</sup>. Ακόμα, παρατηρείται η δόνηση τάσης του δεσμού C=O του καρβονυλίου του οξικού νατρίου με ισχυρή κορυφή στους 1574 $\text{cm}^{-1}$  κυματαριθμούς. Επιπλέον, οι συμμετρικές δονήσεις τάσης του καρβοξυλικού ιόντος -COO<sup>-</sup> <sup>[23]</sup> παρουσιάζονται στο φάσμα με την κορυφή στους 1415 $\text{cm}^{-1}$  κυματαριθμούς ενώ οι δονήσεις κάμψης της αλυσίδας C-C-C της γλυκερόλης εμφανίζονται με μια χαμηλής έντασης κορυφή στους 1111 $\text{cm}^{-1}$  κυματαριθμούς. Τέλος, η δόνηση τάσης του δεσμού C-O του οξικού νατρίου αποδίδεται με μια ισχυρή κορυφή στα 1000  $\text{cm}^{-1}$ .



Σχήμα 8: Φάσμα FTIR (ATR) του NADES L-Proline-Glycerol 1:2

Στο φάσμα FTIR του NADES L-Proline-Glycerol 1:2 (Σχήμα 8) αρχικά εμφανίζεται μια ευρεία κορυφή χαμηλής έντασης στους κυματαριθμούς 3100-3500cm<sup>-1</sup> με μέγιστη ένταση περίπου στα 3338cm<sup>-1</sup> και οφείλεται σε δόνηση τάσης των υδροξυλομάδων <sup>[23][36]</sup> που βρίσκονται στην γλυκερόλη και στην προλίνη. Το φάσμα επίσης υποδεικνύει τις ασύμμετρες δονήσεις τάσης των δεσμών C-H και -CH<sub>2</sub> με κορυφή στα 3012cm<sup>-1</sup> και τις αντίστοιχες συμμετρικές δονήσεις στα 2970cm<sup>-1</sup> <sup>[23][36][37]</sup>. Ακόμα, παρατηρείται η δόνηση τάσης του δεσμού C=O του καρβονυλίου της προλίνης με ισχυρή κορυφή στα 1738cm<sup>-1</sup> και δόνηση κάμψης του δεσμού N-H της προλίνης σε χαμηλότερης έντασης κορυφή στα 1622cm<sup>-1</sup>. Επιπλέον, οι συμμετρικές δονήσεις τάσης του καρβοξυλικού οξέος -COOH αποδίδονται με μια κορυφή στα 1365cm<sup>-1</sup> και οι δονήσεις κάμψης της αλυσίδας C-C-C της γλυκερόλης εμφανίζονται στο φάσμα με μια χαμηλής έντασης κορυφή στα 1113cm<sup>-1</sup>. Τέλος, η δόνηση τάσης του δεσμού C-O αποδίδεται με μια ισχυρή διπλή κορυφή στα 1210 και 1228 cm<sup>-1</sup> ενώ η δόνηση τάσης του δεσμού C-N της προλίνης δίνει μια υψηλής έντασης κορυφή στα 1043cm<sup>-1</sup>.

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 19) παρουσιάζονται οι κύριες χαρακτηριστικές ομάδες όπως ταυτοποιούνται από τα αντίστοιχα φάσματα FTIR (ATR) για τους βαθέως ευτηκτικούς διαλύτες Sodium Acetate-Gly 1:9, Pro-Gly 1:2 και Bet-Gly 1:2.

Πίνακας 19: Απόδοση των χαρακτηριστικότερων κορυφών απορρόφησης των FTIR φασμάτων των υπό εξέταση NADES

Είδος δόνησης * / δεσμός	DES		
	Sodium Acetate-Gly 1:9	Pro-Gly 1:2	Bet-Gly 1:2
$\nu$ (O-H)	3294	3338	3311
$\nu_{as}$ (C-H), $\nu_{as}$ (-CH <sub>2</sub> )	2937	3012	2931
$\nu_s$ (C-H), $\nu_s$ (-CH <sub>2</sub> )	2885	2970	2879
$\nu$ (C=O)	1574	1738	1626
$\delta$ (N-H)	#	1622	#
$\nu_s$ (COO <sup>-</sup> )	1415	1365	1397
$\delta$ (C-C-C)	1111	1113	1111
$\nu$ (C-N)	#	1043	1040
$\nu$ (O-C)	1000	1210	#

\*  $\nu$ -τάση,  $\nu_s$ -συμμετρική τάση,  $\nu_{as}$ -ασύμμετρη τάση,  $\delta$ -κάμψη, #-δεν παρατηρήθηκε

### 3.3 Μελέτη διαλυτότητας καζεΐνης

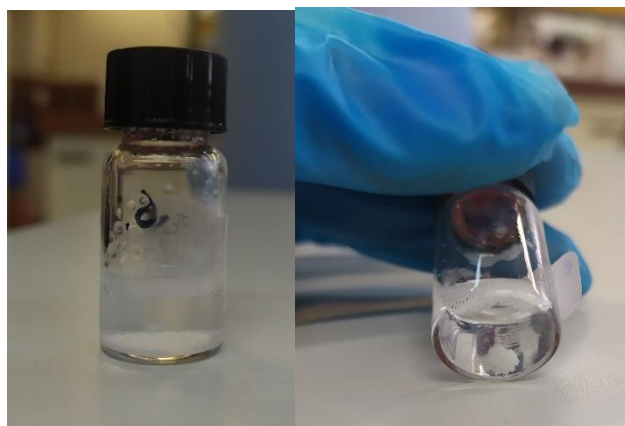
#### 3.3.1 Δοκιμές διάλυσης καζεΐνης

Είναι σημαντικό να βρεθεί ο τρόπος με τον οποίο η καζεΐνη μπορεί να διαλυθεί στο διάλυμα που πρόκειται να γίνει πρωτεϊνικό φιλμ γι' αυτό και πραγματοποιήθηκε μια μελέτη διερεύνησης διαφόρων συστημάτων στα οποία θα ήταν επιθυμητό να διαλύεται η καζεΐνη ώστε στη συνέχεια να πραγματοποιηθεί ο σχηματισμός των μεμβρανών καζεΐνης.

Αρχικά πραγματοποιήθηκε προσθήκη της καζεΐνης σε νερό όπου όπως και αναμενόταν, παρέμεινε αδιάλυτη όπως απεικονίζεται στην Εικόνα 13Α. Έπειτα από θέρμανση του διαλύματος στους 60°C δημιουργήθηκαν συσσωμάτωμα όπως φαίνεται στην Εικόνα 13Β. Όταν το σύστημα ψύχθηκε σε θερμοκρασία δωματίου επανήρθε στην αρχική του κατάσταση.

Στη συνέχεια, δοκιμάστηκε η διάλυση της καζεΐνης στα NADES καθώς στη βιβλιογραφία έχει παρατηρηθεί πως κάποια NADES έχουν πολύ καλή διαλυτική ικανότητα σε πολικές και άπολες ενώσεις και έχουν χρησιμοποιηθεί για διάλυση ή ανάκτηση ποικίλων πρωτεϊνών.<sup>[18][24]</sup> Όμως, η καζεΐνη παρέμεινε αδιάλυτη στους καθαρούς NADES που παρασκευάστηκαν στην παρούσα μελέτη ακόμη και έπειτα από θέρμανση του συστήματος ή και την εφαρμογή υπερήχων. Το ίδιο παρατηρήθηκε και στα συστήματα NADES-νερού. Τελικά, η μόνη διαφορά στη διαλυτότητα της καζεΐνης παρατηρήθηκε μετά την προσθήκη διαλύματος NaOH 1M σε μίγμα καζεΐνης-NADES όπου μετά την ανάδευση και τη θέρμανση τους (60°C), η καζεΐνη διαλύθηκε και το μίγμα μετατράπηκε σε ένα ομογενές διάλυμα.

Έτσι, κατά την παρασκευή των φιλμ, η προσθήκη μερικών σταγόνων NaOH 1M, για την ρύθμιση του pH, και η θέρμανση του διαλύματος ήταν απαραίτητα βήματα προκειμένου να διαλυθεί πλήρως η καζεΐνη. Αυτό συμβαίνει καθώς όσο αυξάνεται το pH, απομακρύνεται η τιμή του από το ισοηλεκτρικό σημείο της καζεΐνης επομένως, η καζεΐνη διαλύεται ευκολότερα.



Εικόνα 13 A&B: Υδατικό διάλυμα καζεΐνης πριν (A) και μετά (B) την θέρμανση

### 3.3.2 Καμπύλη καζεΐνης

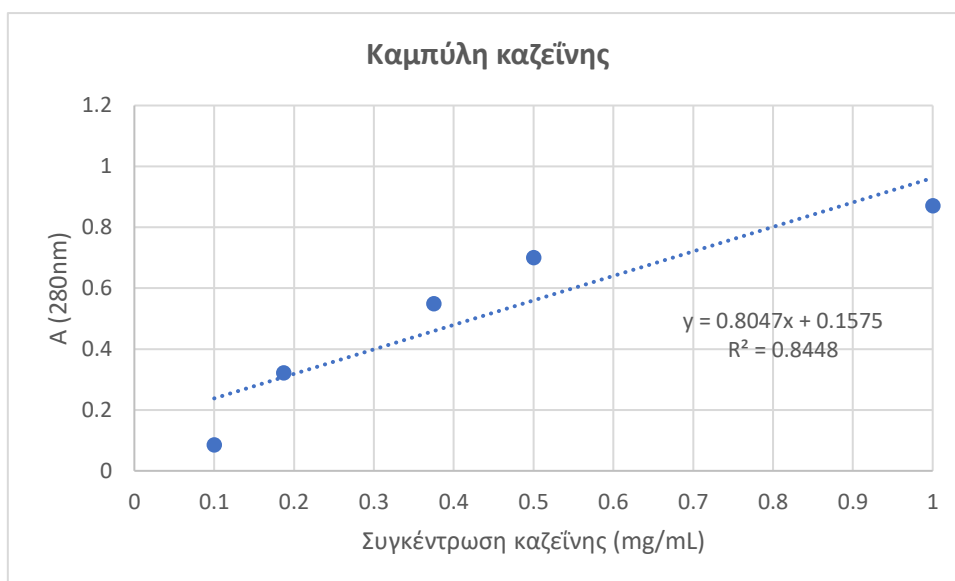
Προκειμένου να μπορεί να υπολογιστεί η συγκέντρωση της καζεΐνης σε άγνωστα διαλύματα που περιέχουν πρωτεΐνες, για παράδειγμα απόβλητα γαλακτοβιομηχανίας από διάφορα στάδια, είναι απαραίτητο να σχηματιστεί η χαρακτηριστική καμπύλη απορρόφησης της στο UV-Vis.

Στο παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι απορροφήσεις στο UV-Vis στα 280nm των διαφορετικής συγκέντρωσης διαλυμάτων καζεΐνης σε απιονισμένο νερό με συγκέντρωση NaOH 0,02M (ώστε να επιτευχθεί διάλυση). Έτσι, σχηματίστηκε η χαρακτηριστική καμπύλη της καζεΐνης (Διάγραμμα 3).

Πίνακας 20: Τιμές απορρόφησης της καζεΐνης στα 280nm για διαφορετικές συγκεντρώσεις

Συγκέντρωση καζεΐνης σε mg/mL	Απορρόφηση 280nm
1	0.871
0.5	0.701
0.375	0.548
0.187	0.322
0.1	0.085

Όπως φαίνεται στον παραπάνω πίνακα, αποδεκτές τιμές απορροφήσεων λήφθηκαν σε συγκεντρώσεις καζεΐνης μέχρι 1 mg/mL. Η πρότυπη καμπύλης της καζεΐνης μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως αναφορά για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης της σε άγνωστο διάλυμα.



Διάγραμμα 3: Χαρακτηριστική καμπύλη συγκέντρωσης καζεΐνης-απορρόφησης στα 280nm


### 3.4 Σχηματισμός βιοσυμβατών πρωτεϊνικών φιλμ




#### 3.4.1 Φιλμ καζεΐνης

Όπως αναφέρθηκε, δεν υπάρχουν βιβλιογραφικά δεδομένα για το σχηματισμό πρωτεϊνικών φιλμ καζεΐνης με χρήση NADES ως πλαστικοποιητές. Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε μια μελέτη παρασκευής πρωτεϊνικών φιλμ χρησιμοποιώντας ως πλαστικοποιητές διαφορετικά NADES. Για την έρευση της κατάλληλης μεθοδολογίας πραγματοποιήθηκαν ποικίλες δοκιμές με διαφορετικά NADES και ποικίλες αναλογίες NADES- καζεΐνης οι οποίες παρουσιάζονται και στους παρακάτω πίνακες (Πίνακας 21-22). Για κάθε NADES φαίνεται πως υπάρχει μια διαφορετική κατάλληλη αναλογία στην οποία το παρασκευασμένο φιλμ να μην είναι εύθραυστο λόγω έλλειψης πλαστικοποιητή αλλά ούτε και αρκετά κολλώδες, λόγω περίσσειας του NADES.



Ακολουθεί ο Πίνακας 21 στον οποίο αναγράφονται τα αποτελέσματα όλων των δοκιμών για φιλμ καζεΐνης με πλαστικοποιητές τους έξι NADES που παρασκευάστηκαν στοχευμένα για αυτή την εφαρμογή.

Πίνακας 21: Παρασκευή φιλμ καζεΐνης με χρήση NADES

Κωδικός	NADES	αναλογία καζεΐνης-DES	Σχηματισμός φιλμ	Εικόνα
F1	Bet-Gly 1:2	2:1	✓	

F2	Bet-Gly 1:2	1:1	✓	
F3	Bet-Gly 1:2	1:2	✗	
F4	Bet-Gly-W 1:2:1	3:1	✗	
F5	Bet-Gly-W 1:2:1	2:1	✓	
F6	Bet-Gly-W 1:2:1	1:1	✓	
F7	Bet-Gly-W 1:2:1	1:2	✗	
F8	ChCl-Gly 1:2	3:1	✗	
F9	ChCl-Gly 1:2	2:1	✓	
F10	ChCl-Gly 1:2	1:1	✗	

F11	ChCl-Gly-W 1:2:1	3:1	X	
F12	ChCl-Gly-W 1:2:1	2:1	✓	
F13	ChCl-Gly-W 1:2:1	1:1	X	
F14	Pro-Gly 1:2	3:1	X	
F15	Pro-Gly 1:2	2:1	X	
F16	Pro-Gly 1:2	1:1	✓	
F17	Pro-Gly 1:2	1:2	✓	
F18	Sodium Acetate - Gly 1:9	2:1	X	

F19	Sodium Acetate-Gly 1:9	1:1	✓	
F20	Sodium Acetate-Gly 1:9	1:2	✗	

Παρατηρήθηκε ότι για το ίδιο NADES, όσο αυξάνεται η περιεκτικότητα του στο φιλμ (αναλογία πρωτεΐνης-NADES είναι μεγαλύτερη του 1:1) αποκτά πλαστικότητα μέχρι ένα σημείο ενώ έπειτα όταν η ποσότητα του NADES αυξάνεται υπάρχει δυσκολία στο σχηματισμό του φιλμ. Αναλυτικότερα, σε μικρή αναλογία πρωτεΐνης-NADES, το φιλμ είναι πιο εύθραυστο ή δεν σχηματίζεται καθόλου με παραδείγματα τα F4, F8, F11, F14 όπου είχαν αναλογία καζεΐνης-DES 3:1 και τα φιλμ F15 (Pro-Gly 1:2) και F18 (Sodium Acetate-Gly 1:2) όπου είχαν αναλογία καζεΐνης-DES 2:1. Αντίθετα, σε μεγάλη περιεκτικότητα του NaDES, τα φιλμ είναι πολύ μαλακά και κολλώδη ή δεν σχηματίζονται. Σε αυτή την περίπτωση παραδείγματα αποτελούν τα F3 (Bet-Gly 1:2), F20 (Sodium Acetate-Gly 1:2) και F7 (Bet-Gly-W 1:2:1) όπου είχαν αναλογία καζεΐνης-DES 1:2 και τα F10 (ChCl-Gly 1:2), F13 (ChCl-Gly-W 1:2:1) όπου είχαν αναλογία καζεΐνης-DES 1:1.

Παρατηρείται επίσης πως στις περιπτώσεις που χρησιμοποιήθηκαν NADES με κύριο συστατικό τη χολίνη, στο μεγαλύτερο ποσοστό των προσπαθειών δεν προέκυψαν επιτυγχών φιλμ με εξαίρεση τα φιλμ F9 (ChCl-Gly 1:2) και F12 (ChCl-Gly-W 1:2:1) με αναλογία καζεΐνης-DES 2:1 που παρελήφθησαν φιλμ αλλά δεν ήταν διαυγή όπως τα υπόλοιπα.

Όπως φαίνεται στον παραπάνω πίνακα και σύμφωνα με τον πρώτο οπτικό έλεγχο των φιλμ που προέκυψαν, τα καλύτερα σχηματισμένα φιλμ και με την μεγαλύτερη επαναληψιμότητα είναι τα εξής: F2/Bet-Gly 1:2, F6/Bet-Gly-W 1:2:1, F16, F17/Pro-Gly 1:2, F18/Sodium Acetate-Gly 1:9. Σε αυτά τα 5 επιλεγμένα φιλμ μετρήθηκαν όλες οι ιδιότητες όπως περιγράφηκαν στην ενότητα 2.6.

Δεδομένης της επιτυχούς χρήσης των NADES ως πλαστικοποιητές για τα φιλμ καζεΐνης, θεωρήθηκε σκόπιμο να διερευνηθεί αυτή η μελέτη και να εξεταστεί αν και κατά πόσο δρουν πλαστικοποιητικά και τα αρχικά συστατικά των NADES ξεχωριστά ως παράγοντες πλαστικοποίησης. Γι' αυτό προστέθηκαν στο διάλυμα της καζεΐνης τα μίγματα των συστατικών στην ίδια αναλογία που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των NADES αλλά πριν σχηματιστούν, δηλαδή ως απλό φυσικό μίγμα, προς σχηματισμό φιλμ.

Ακόμα, δοκιμάστηκε να παρασκευαστεί ως φιλμ αναφοράς ένα φιλμ με χρήση γλυκερόλης σε διαφορετικές αναλογίες ως πλαστικοποιητή καθώς είναι ένας από τους πιο γνωστούς πλαστικοποιητές στη βιβλιογραφία για αντίστοιχα πρωτεϊνικά φιλμ.






Επιπλέον, σχηματίστηκε φιλμ με πλαστικοποιητή εκχύλισμα χαμομηλιού που προέκυψε έπειτα από την πράσινη διεργασία εκχύλισης του χαμομηλιού με χρήση του NADES Bet-Gly-W 1:2:1 στα πλαίσια άλλων ερευνητικών μελετών του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας ΕΜΠ. Το εκχύλισμα χαμομηλιού μελετήθηκε ως πλαστικοποιητής σε φιλμ καζεΐνης διότι μπορεί να προσδώσει προστιθέμενη αξία και βιοδραστικότητα στο φιλμ αλλά







και θα εξεταστεί κατά πόσο επηρεάζεται ο σχηματισμός του φιλμ και οι ιδιότητες του χάρη στο εκχύλισμα.

Ακολουθεί ο Πίνακας 22 στον οποίο αναγράφονται τα αποτελέσματα των δοκιμών για φιλμ καζεΐνης με πλαστικοποιητές τα φυσικά μίγματα των DES, γλυκερόλη ή εκχύλισμα χαμομηλιού από NADES.

Πίνακας 22: Παρασκευή φιλμ καζεΐνης με χρήση φυσικών μιγμάτων, εκχυλίσματος χαμομηλιού και γλυκερόλης

Κωδικός	Φυσικό μίγμα	Αναλογία καζεΐνης-πλαστικοποιητή	Σχηματισμός φιλμ	Εικόνα
F21	Bet-Gly 1:2	1:1	✓	
F22	Bet-Gly-W 1:2:1	1:1	✓	
F23	S.A.-Gly 1:9	1:1	✗	
F24	Pro-Gly 1:2	1:1	✓	
F25	Pro-Gly 1:2	1:2	✓	
Κωδικός	NADES-Εκχύλισμα	Αναλογία καζεΐνης-πλαστικοποιητή	Σχηματισμός φιλμ	Εικόνα

F26	Εκχύλισμα Χαμομηλιού με χρήση του NADES Bet-Gly-W 1:2:1	1:1	✓	
Κωδικός	Πλαστικοποιητής Αναφοράς	Αναλογία καζεΐνης-πλαστικοποιητή	Σχηματισμός φιλμ	Εικόνα
F27	Glycerol	2:1	X	
F28	Glycerol	1:1	X	
F29	Glycerol	1:2	X	

Όπως φαίνεται στον παραπάνω πίνακα και σύμφωνα με τον πρώτο οπτικό έλεγχο των φιλμ που προέκυψαν, τα καλύτερα σχηματισμένα φιλμ με την μεγαλύτερη επαναληψιμότητα είναι τα εξής: F21/Bet-Gly 1:2 , F22/Bet-Gly-W 1:2:1 , F24/Pro-Gly 1:2 , F25/Pro-Gly 1:2 (Casein/DES 1:2) , F26/ Χαμομηλιού Bet-Gly-W 1:2:1.

Συγκρίνοντας τα φιλμ καζεΐνης με χρήση NaDES σε σχέση με τα φιλμ στα οποία χρησιμοποιήθηκε η γλυκερόλη ως πλαστικοποιητής παρατηρείται ότι η κατάλληλη περιεκτικότητα των NaDES (αναλογία καζεΐνης-NADES 1:1) μπορεί να αποδίδει καλύτερη πλαστικοποίηση στα φιλμ σε σχέση με τη χρήση γλυκερόλης ως πλαστικοποιητή σε οποιαδήποτε αναλογία καζεΐνης-γλυκερόλης.

Όσον αφορά τα φιλμ που προέκυψαν με χρήση των φυσικών μιγμάτων ως πλαστικοποιητές αντί για NADES, οδήγησαν σε ικανοποιητικά αποτελέσματα και σχηματίζοντας στην πλειοψηφία τους φιλμ. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι κατά την προσθήκη του φυσικού μίγματος, το πρωτεϊνικό διάλυμα είναι θερμό και έπειτα θερμαίνεται ξανά στους 60°C (θερμοκρασία που πραγματοποιείται η σύνθεση των NADES). Επομένως, μια πιθανή εξήγηση είναι ότι ο βαθέως ευτηκτικός διαλύτης σχηματίζεται εντός του διαλύματος και εν τέλει βοηθά στο σχηματισμό φιλμ. Παρόλα αυτά είναι πολύ ενδιαφέρον όπως θα αποδειχθεί και στη συνέχεια με τις περαιτέρω μετρήσεις στα φιλμ, πως

τα φιλμ που προέκυψαν από τη χρήση φυσικών μιγμάτων παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές ως προς τις ιδιότητές τους συγκριτικά με τα φιλμ που παρασκευάζονται παρουσία των αντίστοιχων NADES.



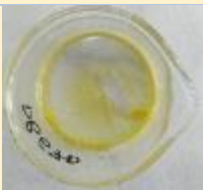
### 3.4.2 Φιλμ πρωτεϊνών ορού γάλακτος





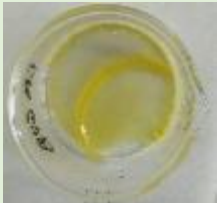

Όπως και στα φιλμ καζεΐνης, έτσι και στα φιλμ WPI έγινε διερεύνηση των βέλτιστων αναλογιών WPI- NADES και επομένως έγιναν πολλές διαφορετικές δοκιμές αναλογιών και NADES για το σχηματισμό των βέλτιστων φιλμ. Αναμένεται να υπάρχει για κάθε NADES μια διαφορετική κατάλληλη αναλογία στην οποία το παρασκευασμένο φιλμ να μην είναι εύθραυστο λόγω έλλειψης πλαστικοποιητή αλλά ούτε και αρκετά κολλώδες, λόγω περίσσειας του NADES. Λόγω της κατευθυντήριας γραμμής που δόθηκε κατά την παρασκευή των φιλμ καζεΐνης, οι δοκιμές για τα φιλμ WPI ήταν λιγότερες και περιείχαν τους NADES των 5 επίλεκτων φιλμ καζεΐνης.

Ακόμα, δοκιμάστηκε να παρασκευαστεί ως φιλμ αναφοράς ένα φιλμ με χρήση γλυκερόλης ως πλαστικοποιητή (σε αναλογία WPI-Gly 1:1) καθώς είναι ένας από τους πιο γνωστούς πλαστικοποιητές στη βιβλιογραφία για αντίστοιχα πρωτεϊνικά φιλμ.

Ακολουθεί ο Πίνακας 23 στον οποίο αναγράφονται τα αποτελέσματα όλων των δοκιμών για φιλμ πρωτεϊνών ορού γάλακτος με πλαστικοποιητές NADES και γλυκερόλη.

Πίνακας 23: Αποτελέσματα παρασκευής φιλμ WPI με NADES και γλυκερόλη

Κωδικός	NADES	Αναλογία WPI-DES	Σχηματισμός φιλμ	Εικόνα
F30	Bet-Gly 1:2	1:1	✓	
F31	Bet-Gly 1:2	1.4:1	✗	
F32	Bet-Gly 1:2	1:1.5	✗	

<b>F33</b>	Bet-Gly-W 1:2:1	1:1	✓	
<b>F34</b>	Bet-Gly-W 1:2:1	1.4:1	✓	
<b>F35</b>	Sodium Acetate-Gly 1:9	1:1	✗	
<b>F36</b>	Sodium Acetate-Gly 1:9	1.3:1	✗	
<b>F37</b>	Pro-Gly 1:2	1.4:1	✗	
<b>F38</b>	Pro-Gly 1:2	1:1	✓	

F39	Pro-Gly 1:2	1:2	X	
Κωδικός	Πλαστικοποιητής Αναφοράς	Αναλογία WPI-Gly	Σχηματισμός φιλμ	Εικόνα
F40	Glycerol	1:1	X	

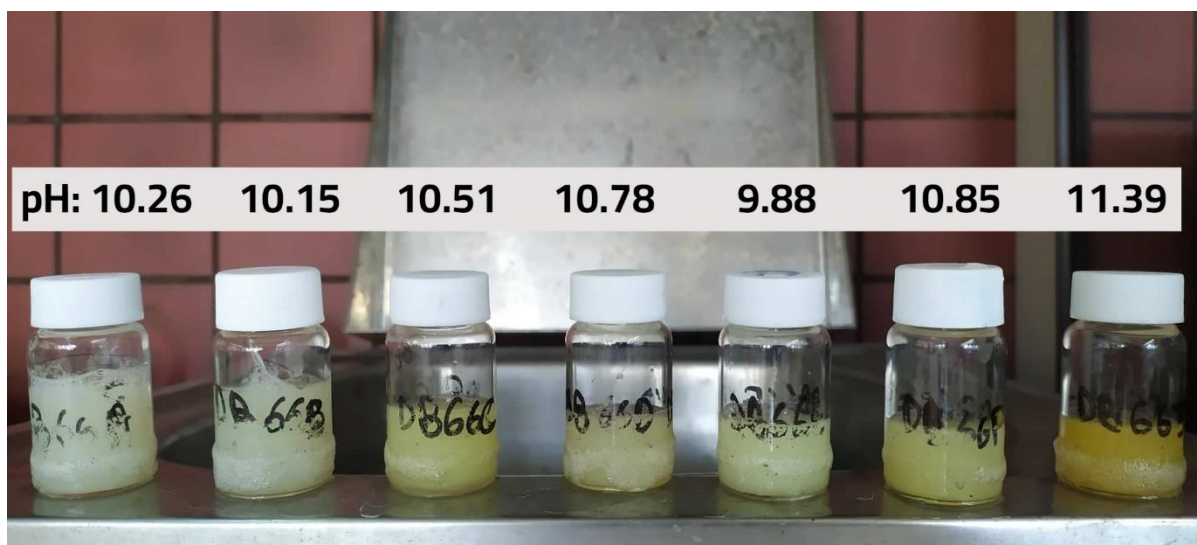
Παρατηρήθηκε ότι για το ίδιο NADES, όσο αυξάνεται η περιεκτικότητα του στο φιλμ (αναλογία πρωτεΐνης-NADES είναι μεγαλύτερη του 1:1) αποκτά πλαστικότητα μέχρι ένα σημείο ενώ έπειτα όταν η ποσότητα του NADES αυξάνεται υπάρχει δυσκολία στο σχηματισμό του φιλμ. Αναλυτικότερα, σε μικρή αναλογία πρωτεΐνης-NADES, το φιλμ είναι πιο εύθραυστο ή δεν σχηματίζεται καθόλου με παραδείγματα τα F31, F34, F37 όπου είχαν αναλογία WPI-NADES 1.4:1. Αντίθετα, σε μεγάλη περιεκτικότητα του NaDES, τα φιλμ είναι πολύ μαλακά και κολλώδη ή δεν σχηματίζονται. Σε αυτή την περίπτωση παραδείγματα αποτελούν τα F32 (Bet-Gly 1:2) όπου είχε αναλογία WPI-NADES 1:1.5 και F39 (Pro-Gly 1:2) όπου είχε αναλογία WPI-NADES 1:2.

Όπως φαίνεται στον παραπάνω πίνακα και σύμφωνα με τον πρώτο οπτικό έλεγχο των φιλμ που προέκυψαν, τα καλύτερα σχηματισμένα φιλμ με μεγαλύτερη επαναληψιμότητα είναι τα εξής: F30/Bet-Gly 1:2, F33/Bet-Gly-W 1:2:1, F38/Pro-Gly 1:2. Σε αυτά τα 3 επιλεγμένα φιλμ μετρήθηκαν όλες οι ιδιότητες όπως περιγράφηκαν στην ενότητα 2.6.

Συγκρίνοντας τα φιλμ WPI με χρήση NADES σε σχέση με το φιλμ στο οποίο χρησιμοποιήθηκε η γλυκερόλη ως πλαστικοποιητής παρατηρείται ότι η κατάλληλη περιεκτικότητα των NaDES (αναλογία καζεΐνης-NADES 1:1) μπορεί να αποδίδει καλύτερη πλαστικοποίηση στα φιλμ σε σχέση με την ίδια περιεκτικότητα γλυκερόλης.

Με μια σύντομη οπτική σύγκριση των φιλμ, είναι αισθητή και από τις εικόνες των Πινάκων 21-23 η διαφορά χρώματος στα φιλμ καθώς όσα περιέχουν πρωτεΐνες ορού γάλακτος είναι καφέ λόγω μετουσίωσης των πρωτεϊνών ορού γάλακτος ενώ τα φιλμ καζεΐνης είναι διάφανα. Εξαίρεση αποτελούν όσα φιλμ καζεΐνης περιέχουν L-Proline ως συστατικό του NADES τους που έχουν το χαρακτηριστικό κίτρινο χρώμα όπως και το αντίστοιχο NADES Pro-Gly 1:2.

Παρατηρήθηκε ότι όσο μεγαλύτερο ήταν το pH του τελικού πρωτεϊνικού διαλύματος (μετά την προσθήκη NaOH), τόσο πιο έντονο κίτρινο χρώμα είχε το διάλυμα, όπως φαίνεται στην Εικόνα 14. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι ήταν πιο εύκολος ο σχηματισμός των φιλμ όσο πιο μεγάλο ήταν το pH. Επομένως, όσο απομακρύνεται το pH του διαλύματος από το ισοηλεκτρικό σημείο των πρωτεϊνών ορού γάλακτος, τόσο πιο εύκολα μπορεί η πρωτεΐνη να μετουσιωθεί κατά τη θέρμανση της και να διαλυθεί πλήρως.



Εικόνα 14: Διαλύματα WPI προς σχηματισμό φιλμ πριν την μετάγγιση τους σε κρυσταλλωτήριο. Σύγκριση pH - Χρώματος

Αξίζει να σημειωθεί ότι η αφαίρεση των φιλμ από τα κρυσταλλωτήρια φάνηκε να επηρεάζεται από το χρονικό διάστημα που μεσολάβησε μεταξύ της αφαίρεσης των φιλμ από το φούρνο και της απομάκρυνσης τους από τα κρυσταλλωτήρια. Συγκεκριμένα, τα φιλμ μετά το πέρας χρόνου από την αφαίρεση τους από το φούρνο έτειναν να σκληραίνουν με αποτέλεσμα να δυσκολευόταν η απομάκρυνση τους από το σκεύος χωρίς να σπάσουν. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην προσρόφηση υγρασίας στο φιλμ και στην μεταβολή των ιδιοτήτων του σύμφωνα με αυτή. Κατά τη διάρκεια μεταξύ της αφαίρεσης των κρυσταλλωτηρίων από το φούρνο έως την περαιτέρω μελέτη τους, διατηρήθηκαν σε Ξηραντήρα.

### 3.5 Χαρακτηρισμός φιλμ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν κάποιες από τις πιο σημαντικές ιδιότητες των πρωτεϊνικών φιλμ όπως: η μάζα, το πάχος, η διαπερατότητα σε υδρατμούς (WVP), η διαλυτότητα σε νερό (WS) και κάποιες σημαντικές μηχανικές τους ιδιότητες όπως προέκυψαν από μετρήσεις ανάλυσης υφής (Burst Strength, Distance at Burst, ελαστικότητα, συνεκτικότητα, ανθεκτικότητα, προσκολλησιμότητα). Επιπλέον, τα φιλμ χαρακτηρίστηκαν με φασματοσκοπία FTIR (ATR).

Από αυτές τις μελέτες αναμένεται να προκύψουν κάποια σημαντικά συμπεράσματα σχετικά με τον τρόπο που επιδρούν οι NADES στις ιδιότητες των πρωτεϊνικών φιλμ.

#### 3.5.1 Μέτρηση μάζας και πάχους

Η μάζα και το πάχος των φιλμ είναι κύριες ιδιότητες που χαρακτηρίζουν ένα υλικό και είναι απαραίτητο να μελετηθούν για τον χαρακτηρισμό τους. Τα φιλμ δεν σχηματίστηκαν σταθερά στην ίδια διάμετρο κρυσταλλωτηρίων επομένως μπορούν να γίνουν συγκρίσεις μόνο για τα φιλμ ίδιας διαμέτρου αλλά και να παρατηρηθεί κάποια τάση ανάλογα με τη αυτή της διαμέτρου που παρασκευάζεται κάθε φιλμ.

Στους παρακάτω πίνακες (Πίνακες 24-26) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων μάζας και πάχους για τα επίλεκτα φιλμ που σχηματίστηκαν σε σχέση με τη διάμετρο τους. Στα δείγματα που έγιναν τουλάχιστον 3 επαναλήψεις μετρήθηκε η τυπική απόκλιση.

Πίνακας 24: Μέσοι όροι μάζας και πάχους για τα βέλτιστα πρωτεϊνικά φιλμ καζεΐνης – NADES σε σχέση με τη διάμετρο τους

Κωδικός / NADES	Διάμετρος (cm)	Μ.Ο. πάχους (mm)	Τυπική απόκλιση	Μ.Ο. μάζας (g)	Τυπική απόκλιση
F2/ Bet-Gly 1:2	2.8	0.5722	-	0.4058	-
	5.6	0.2501	0.0035	0.7937	0.0088
	6.6	0.2084	-	0.9255	-
	9.5	0.1696	-	1.3602	-
F6/ Bet-Gly-W 1:2:1	2.8	0.3106	-	0.3201	-
	5.6	0.2580	0.0126	0.7748	0.0220
F16/ Pro-Gly 1:2 (αναλογία καζεΐνης/NADES 1:1)	5.6	0.2417	-	0.7547	-
	8.8	0.1900	-	1.2594	-
	9	0.1700	-	1.3570	-
	9.5	0.1500	-	1.3040	-
F17/ Pro-Gly 1:2 (αναλογία καζεΐνης/NADES 1:2)	5.6	0.3588	-	1.2219	-
	8.8	0.2680	-	1.9223	-
	9	0.2630	-	2.0071	-
F19/ Sodium Acetate-Gly 1:9	5.6	0.2487	0.0347	0.7658	0.0337

Συγκρίνοντας το πάχος των φιλμ καζεΐνης σε σχέση με το DES που χρησιμοποιήθηκε ως πλαστικοποιητής δεν παρατηρούνται ουσιαστικές διαφορές για φιλμ ίδιων διαμέτρων με εξαίρεση το F17/ Pro-Gly 1:2 (αναλογία καζεΐνης/NADES 1:2) που εμφανίζει μεγαλύτερο πάχος σε σχέση με όλα τα υπόλοιπα φιλμ. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην διπλάσια περιεκτικότητα του σε DES. Όμοια διαφορά παρατηρείται και στη σύγκριση μάζας των φιλμ.

Πίνακας 25: Μέσοι όροι μάζας και πάχους για τα βέλτιστα πρωτεϊνικά φιλμ καζεΐνης – φυσικό μίγμα και καζεΐνης – εκχύλισμα σε σχέση με τη διάμετρο τους

Κωδικός / φυσικό μίγμα	Διάμετρος (cm)	Μ.Ο. πάχους (mm)	Τυπική απόκλιση	Μ.Ο. μάζας (g)	Τυπική απόκλιση
F21/ Bet-Gly 1:2	9.5	0.1789	-	1.4702	-
F22/ Bet-Gly-W 1:2:1	4.8	0.2086	-	0.6416	-
	9	0.1830	-	1.3440	-
F24/ Pro-Gly 1:2 (αναλογία καζεΐνης/NADES 1:1)	4.5	0.2098	-	0.5466	-
	6.6	0.2343	-	0.9908	-
	9.5	0.1522	-	1.3575	-
F25/ Pro-Gly 1:2 (αναλογία	4.5	0.2806	-	0.9230	-
	6.6	0.2535	0.0504	1.4731	0.0553

καζεΐνης/NADES 1:2)					
Κωδικός / NADES- εκχύλισμα					
F26/ NADES (Bet- Gly-W 1:2:1)- εκχύλισμα χαμομηλιού	6.6	0.1920	-	0.9193	-
	9.5	0.1866	-	1.2610	-

Συγκρίνοντας το πάχος των φιλμ καζεΐνης σε σχέση με το διαλύτη που χρησιμοποιήθηκε ως πλαστικοποιητής δεν παρατηρούνται ουσιαστικές διαφορές για φιλμ ίδιων διαμέτρων με εξαίρεση το F17/ Pro-Gly 1:2 (αναλογία καζεΐνης/NADES 1:2) που εμφανίζει μεγαλύτερο πάχος σε σχέση με όλα τα υπόλοιπα φιλμ. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην διπλάσια περιεκτικότητα του σε DES. Όμοια διαφορά παρατηρείται και στη σύγκριση μάζας των φιλμ. Ακόμη, φαίνεται το F21/ Bet-Gly 1:2 να έχει μεγαλύτερη μάζα σε σχέση με τα φιλμ αντίστοιχης διαμέτρου.

Πίνακας 26: Μέσοι όροι μάζας και πάχους για τα βέλτιστα πρωτεϊνικά φιλμ WPI – NADES σε σχέση με τη διάμετρο τους

Κωδικός / NADES	Διάμετρος (cm)	Μ.Ο. πάχους (mm)	Τυπική απόκλιση	Μ.Ο. μάζας (g)	Τυπική απόκλιση
F30/ Bet-Gly 1:2	5.6	0.2387	0.0525	0.8188	0.0379
	6.6	0.1956	-	0.9593	-
F33/ Bet-Gly-W 1:2:1	5.6	0.2467	0.0362	0.7762	0.0846
	6.6	0.1938	-	0.9041	-
F38/ Pro-Gly 1:2	5.6	0.2813	0.0171	0.8024	0.0239
	6.6	0.1846	-	0.9708	-
	9.0	0.2510	-	1.2075	-
	9.5	0.2038	-	1.3556	-

Συγκρίνοντας το πάχος των φιλμ WPI σε σχέση με το DES που χρησιμοποιήθηκε ως πλαστικοποιητής δεν παρατηρούνται ουσιαστικές διαφορές για φιλμ ίδιων διαμέτρων. Κατά τη σύγκριση της μάζας των φιλμ παρατηρείται ότι το F33/ Bet-Gly-W 1:2:1 έχει μικρότερη μάζα σε σχέση με τα άλλα φιλμ ίδιων διαμέτρων.

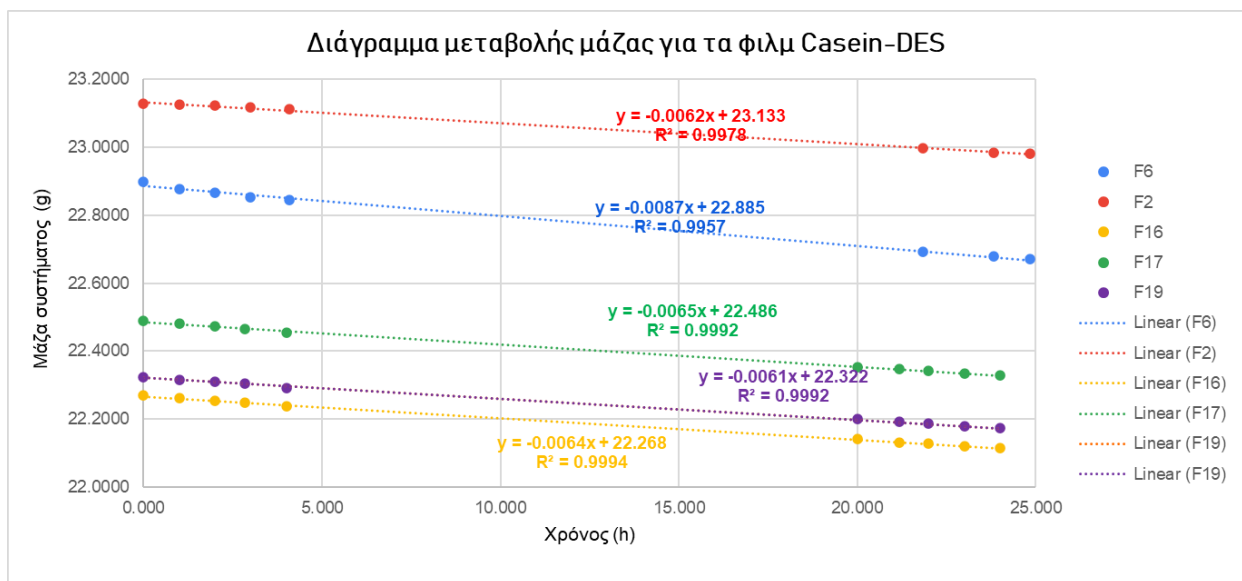
Από τους παραπάνω πίνακες παρατηρείται ότι όσο αυξάνεται η διάμετρος του σκεύους στο οποίο σχηματίζεται το φιλμ και κατ' επεκταση η διάμετρος του φιλμ, το πάχος του μειώνεται. Αυτό συμβαίνει πιθανόν γιατί η αυξημένη επιφάνεια συμβάλλει στην μεγαλύτερη εξάτμιση του περιεχομένου νερού στον ίδιο χρόνο ξήρανσης επομένως το φιλμ έχει μικρότερο όγκο άρα και μικρότερο πάχος. Αντίθετα, παρατηρείται ότι το βάρος αυξάνεται με την αύξηση της διαμέτρου καθώς αυξάνεται η ποσότητα της πρωτεΐνης και του πλαστικοποιητή που παραμένουν στο σύστημα κατά την απομάκρυνση νερού (μέθοδος casting) και το σχηματισμό των φιλμ.



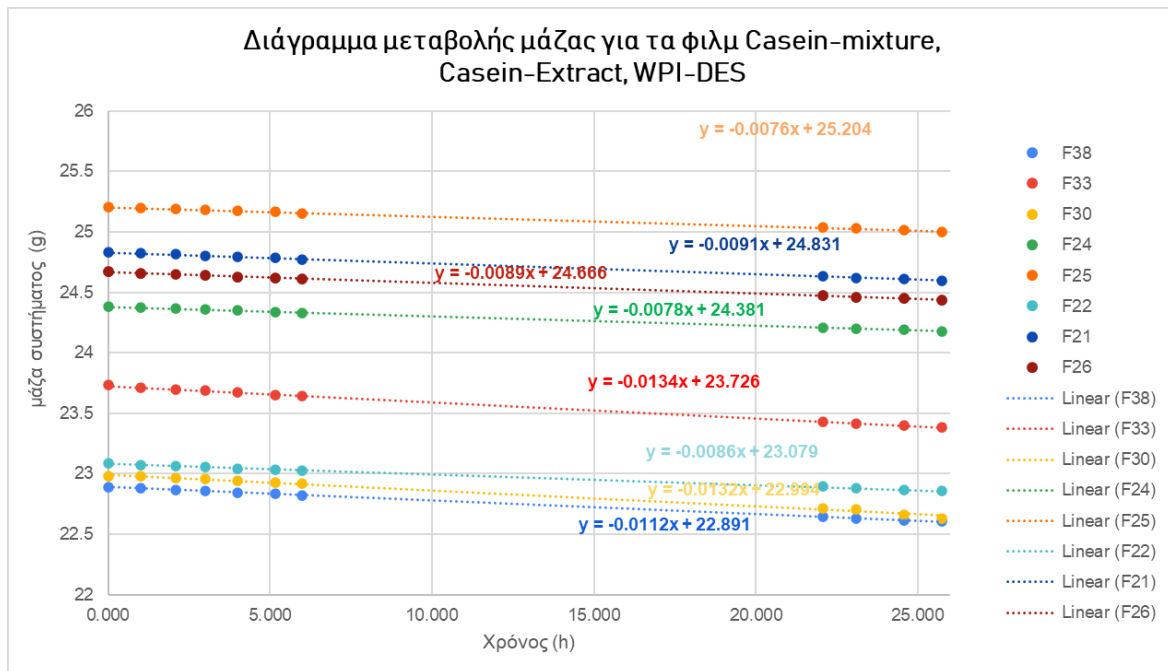
### 3.5.2. Μέτρηση διαπερατότητας υδρατμών

Η διαπερατότητα υδρατμών (Water Vapor Permeability) είναι μια από τις πιο σημαντικές ιδιότητες για τα βιοπλαστικά στη συσκευασία τροφίμων καθώς η υγρασία αποτελεί κύριο παράγοντα αλλοίωσης των τροφίμων και επηρεάζει σημαντικά τη διάρκεια ζωής του. Έτσι, είναι επιθυμητό, η διαπερατότητα υδρατμών να έχει χαμηλές τιμές στις συγκεκριμένες εφαρμογές.

Για τον προσδιορισμό της διαπερατότητας υδρατμών, μετρήθηκε (στα καλύτερα σχηματισμένα φιλμ) η απώλεια μάζας του συστήματος σε σχέση με το χρόνο για χρονικό διάστημα 24 ωρών. Από το διάγραμμα μάζας-χρόνου για κάθε φιλμ υπολογίστηκε η κλίση  $g/t$  (g/s). Ο υπολογισμός της κλίσης από τη γραμμή τάσης φαίνεται στα παρακάτω διαγράμματα για κάθε κωδικό φιλμ, όπως ονομάστηκαν στους Πίνακες 21-23.



Διάγραμμα 4: Διάγραμμα μάζας-χρόνου για τον υπολογισμό του ρυθμού απώλειας μάζας για τα βέλτιστα φιλμ καζεΐνης - DES



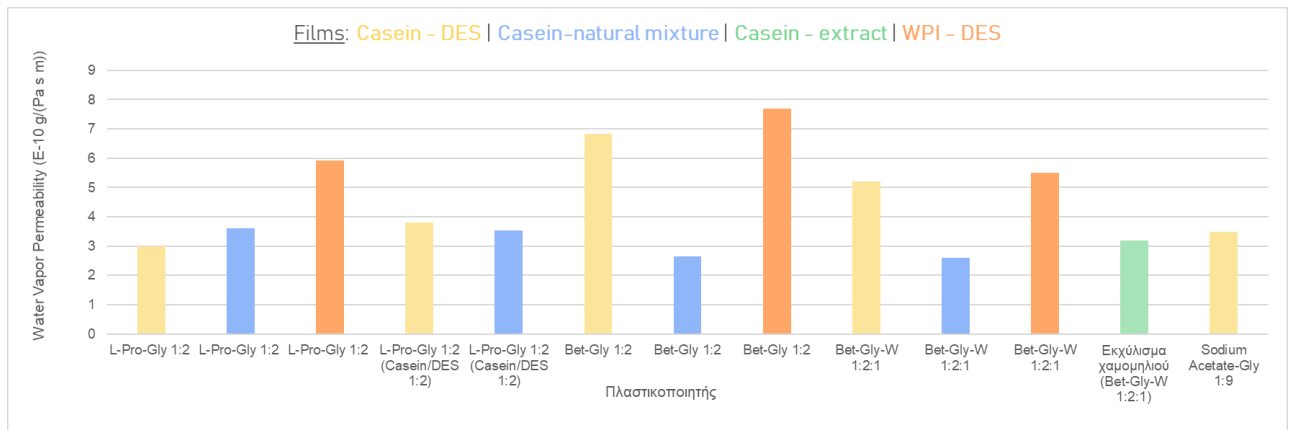
Διάγραμμα 5: Διάγραμμα μάζας-χρόνου για τον υπολογισμό του ρυθμού απώλειας μάζας για τα βέλτιστα φιλμ καζεΐνης - φυσικού μίγματος, καζεΐνης - εκχυλίσματος, WPI - DES

Ισχύει ότι η επιφάνεια του κάθε φιλμ ήταν  $0.000615752 \text{ m}^2$  και η μερική πίεση ατμών ήταν  $\Delta P = 2338.8 \text{ Pa}$  στους  $20^\circ\text{C}$ . Έτσι, με δεδομένα πάχους για κάθε φιλμ από την παράγραφο 3.4.1 και με αντικατάσταση στη σχέση (4) υπολογίστηκε η WVP όπως φαίνεται στον Πίνακα 27.

Πίνακας 27: Διαπερατότητα υδρατμών για κάθε είδος φιλμ

Κωδικός	Πλαστικοποιητής	Είδος φιλμ	WVP (g/(m s Pa))
F6	Bet:Gly:W 1:2:1	Casein -DES	5.21218E-10
F2	Bet:Gly 1:2	Casein -DES	6.84287E-10
F16	Pro:Gly 1:2	Casein -DES	2.98987E-10
F17	Pro:Gly 1:2 (αναλογία καζεΐνης/NADES 1:2)	Casein -DES	3.81392E-10
F19	Sodium Acetate-Gly 1:9	Casein -DES	3.47567E-10
F38	Pro:Gly 1:2	WPI - DES	5.91061E-10
F33	Bet:Gly:W 1:2:1	WPI - DES	5.51049E-10
F30	Bet:Gly 1:2	WPI - DES	7.69935E-10
F24	Pro:Gly 1:2	Casein - mixture	3.61081E-10
F25	Pro:Gly 1:2 (αναλογία καζεΐνης/NADES 1:2)	Casein - mixture	3.53875E-10
F22	Bet:Gly:Water 1:2:1	Casein - mixture	2.60102E-10
F21	Bet:Gly 1:2	Casein - mixture	2.66096E-10
F26	NADES (Bet:Gly:W 1:2:1)- εκχύλισμα χαμομηλιού	Casein - extract	3.20332E-10

Με βάση τις τιμές του παραπάνω πίνακα κατασκευάστηκε το παρακάτω διάγραμμα στηλών (Διάγραμμα 6) με στόχο την διευκόλυνση της σύγκρισης της WVP των φιλμ.



Διάγραμμα 6: Διάγραμμα στηλών για την διαπερατότητα υδρατμών των φιλμ σε σχέση με τον χρησιμοποιούμενο πλαστικοποιητή και χρωματικός διαχωρισμός με βάση το είδος του κάθε φιλμ

Στο παραπάνω διάγραμμα (Διάγραμμα 6) υπάρχει χρωματική κωδικοποίηση για το φιλμ. Το κίτρινο αφορά φιλμ καζεΐνης με χρήση NADES, το μπλε φιλμ καζεΐνης με χρήση φυσικών μιγμάτων, το πράσινο το φιλμ καζεΐνης με εκχύλισμα χαμομηλιού και το πορτοκαλί τα φιλμ WPI. Όλα τα φιλμ έχουν σχηματιστεί με αναλογία πρωτεΐνης- NADES 1:1 εκτός από τα φιλμ καζεΐνης με πλαστικοποιητή το NADES Pro-Gly 1:2 και το αντίστοιχο με το φυσικό του μίγμα που είχαν αναλογία καζεΐνης-πλαστικοποιητή 1:2.

Από τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης φαίνεται ότι η διαπερατότητα υδρατμών των φιλμ επηρεάζεται τόσο από το είδος του φιλμ (καζεΐνης ή WPI) όσο και από το είδος του πλαστικοποιητή. Για τον ίδιο διαλύτη, την μεγαλύτερη διαπερατότητα υδρατμών φαίνεται ότι εμφανίζουν τα φιλμ WPI.

Όσον αφορά στα φιλμ καζεΐνης, από τη μελέτη αυτή φαίνεται πως τη μικρότερη διαπερατότητα υδρατμών παρουσιάζουν τα φιλμ καζεΐνης που παρασκευάστηκαν με χρήση φυσικού μίγματος. Εξάιρεση αποτελεί το φιλμ που προέκυψε από το φυσικό μίγμα Pro:Gly 1:2 όπου ωστόσο, και πάλι η διαφορά της τιμής δεν είναι σημαντική συγκριτικά με αυτή που προκύπτει από το φιλμ που σχηματίστηκε από το αντίστοιχο NADES.

Όσον αφορά στο φιλμ καζεΐνης όπου χρησιμοποιήθηκε εκχύλισμα χαμομηλιού (που προέκυψε έπειτα από εκχύλιση με χρήση του διαλύτη Bet-Gly-W 1:2:1 και χρησιμοποιήθηκε ως έχει για την παρασκευή φιλμ) ως πλαστικοποιητής, βρέθηκε πως παρουσιάζει αρκετά μειωμένη διαπερατότητα υδρατμών σε σχέση με το φιλμ που σχηματίστηκε με τη χρήση του NADES Bet-Gly-W 1:2:1 ως πλαστικοποιητή και λίγο μεγαλύτερη διαπερατότητα υδρατμών από το αντίστοιχο φιλμ με χρήση φυσικού μίγματος.

Επιπλέον, παρατηρείται ότι τη μεγαλύτερη διαπερατότητα υδρατμών παρουσιάζει το φιλμ που προέρχεται από τη χρήση του NADES Bet-Gly 1:2 και για τις δυο εξεταζόμενες κατηγορίες πρωτεϊνικών φιλμ. Στα φιλμ καζεΐνης με πλαστικοποιητή φυσικά μίγματα μεγαλύτερη WVP έχει το φιλμ με διαλύτη μίγμα Pro-Gly 1:2.

Επομένως, για την επιλογή του διαλύτη που θα σχηματίσει φιλμ με τη μικρότερη δυνατή WVP, θα πρέπει να ληφθεί υπόψη αν το είδος του πλαστικοποιητή (NADES, εκχύλισμα-NADES ή φυσικό μίγμα) και το είδος της πρωτεΐνης.

Συγκρίνοντας τις τιμές της διαπερατότητας υδρατμών με τις βιβλιογραφικές τιμές <sup>[11][14][15]</sup> για τα φιλμ καζεΐνης με πλαστικοποιητή γλυκερόλη στα οποία υπολογίζεται  $WVP = 27.2 \cdot 10^{-10} \frac{g}{m s Pa}$  <sup>[11]</sup>,  $WVP = 1.6 - 11 \cdot 10^{-10} \frac{g}{m s Pa}$  <sup>[14]</sup>,  $WVP = 19.4 \cdot 10^{-10} \frac{g}{m s Pa}$  <sup>[15]</sup>, παρατηρείται ότι τα φιλμ με πλαστικοποιητή DES έχουν μικρότερη διαπερατότητα υδρατμών από τα αντίστοιχα συμβατικά φιλμ με γλυκερόλη. Οι βιβλιογραφικές τιμές <sup>[11][14][15][29]</sup> για τα φιλμ WPI ή WPC με πλαστικοποιητή γλυκερόλη κυμαίνονται σε  $WVP = 28.9 \cdot 10^{-10} \frac{g}{m s Pa}$  <sup>[11]</sup>,  $WVP = 2 - 36 \cdot 10^{-10} \frac{g}{m s Pa}$  <sup>[14]</sup>,  $WVP = 0.926 \cdot 10^{-10} \frac{g}{m s Pa}$  <sup>[15]</sup>,  $WVP = 13.78 \cdot 10^{-10} \frac{g}{m s Pa}$  <sup>[29]</sup>. Επομένως, συγκρίνοντας με τα φιλμ WPI-DES παρατηρείται ότι η διαπερατότητα υδρατμών τους βρίσκεται εντός βιβλιογραφικών ορίων σε χαμηλές τιμές.

Η περιορισμένη αντίσταση των πρωτεϊνικών μεμβρανών στη διαπέραση υδρατμών αποδίδεται στην εγγενή υδροφιλία των πρωτεϊνών και στις σημαντικές ποσότητες υδρόφιλων πλαστικοποιητών που ενσωματώνονται στα φιλμ τους. Επιπλέον, η θερμοκρασία, οι αλλαγές της σχετικής υγρασίας που εφαρμόζονται στα φιλμ και το πάχος του φιλμ επηρεάζουν τις τιμές WVP των πρωτεϊνικών φιλμ. <sup>[12]</sup>

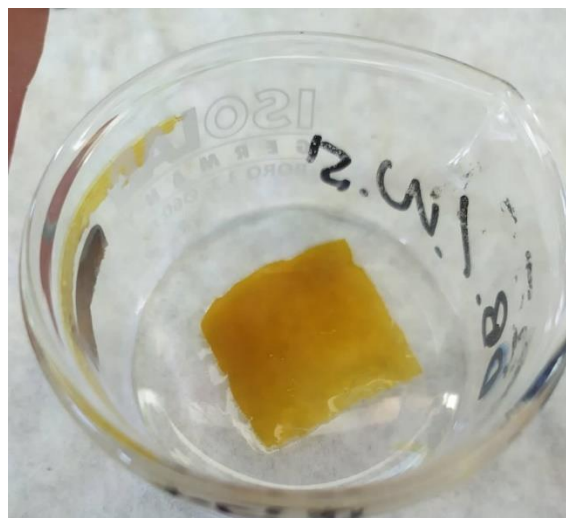
### 3.5.3 Μέτρηση διαλυτότητας

#### Φιλμ καζεΐνης

Το φιλμ καζεΐνης μετά την ξήρανση στους 100°C, είχε αρχικό Ξηρό βάρος  $M_i = 0.2926g$ . Μετά από 24h ανάδευσης σε νερό σε θερμοκρασία δωματίου το φιλμ διαλύθηκε πλήρως στο νερό, επομένως η τελική μάζα  $M_f = 0$ . Σύμφωνα με την σχέση (5)  $WS = 100\%$  επομένως το φιλμ είναι πλήρως υδατοδιαλυτό.

#### Φιλμ WPI

Το φιλμ πρωτεϊνών ορού γάλακτος μετά την ξήρανση στους 100°C, είχε αρχικό Ξηρό βάρος  $M_i = 0.0787g$ . Μετά από 24 ώρες ανάδευσης σε νερό σε θερμοκρασία δωματίου το φιλμ δε διαλύθηκε πλήρως στο νερό όπως φαίνεται στην Εικόνα 14 και ακολούθησε Ξήρανση του στους 100°C ξανά για 24h. Η τελική μάζα ζυγίστηκε  $M_f = 0.0389g$ . Σύμφωνα με τη σχέση (5)  $WS = 50.57\%$  επομένως το φιλμ WPI διαλύεται στο νερό κατά το ήμισυ.



Εικόνα 14: Φιλμ WPI μετά την εμβάπτιση του σε νερό για 24 ώρες κατά την μελέτη διαλυτότητας του

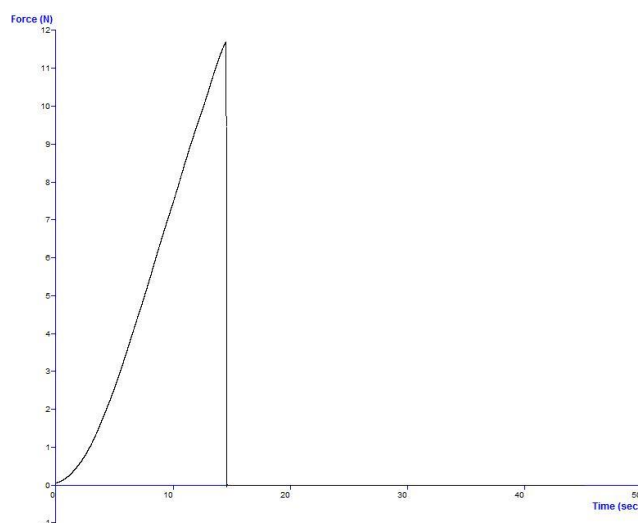
Συγκρίνοντας τη διαλυτότητα των δύο ειδών φιλμ (Casein-DES και WPI-DES), αποδείχθηκε ότι το φιλμ που δεν είναι πλήρως υδατοδιαλυτό είναι το WPI γεγονός που το καθιστά ευνοϊκότερο στη χρήση του για επικάλυψη τροφίμων καθώς τα τρόφιμα έχουν υψηλά ποσοστά υγρασίας.

Συγκρίνοντας τη διαλυτότητα του WPI φιλμ με τις αντίστοιχες τις βιβλιογραφικές αναφορές παρατηρείται ότι είναι εντός βιβλιογραφικών δεδομένων καθώς  $WS=40-50\%$  [31] για WPI φιλμ με πλαστικοποιητή σορβιτόλη και ξεπερνά την  $WS=20-25\%$  [29] για WPI φιλμ με γλυκερόλη. Επομένως, τα φιλμ πρωτεϊνών ορού γάλακτος με NADES για πλαστικοποιητές έχουν μεγαλύτερη αντίσταση σε διάλυση από νερό. Κύρια προϋπόθεση για την χαμηλή διαλυτότητα των φιλμ WPI στο νερό είναι η μετουσίωση των πρωτεϊνών πριν το σχηματισμό των φιλμ.<sup>[29]</sup>

### 3.5.4 Ανάλυση υφής

#### 3.5.4.1 Δοκιμή θραύσης

Κατά τη δοκιμή θραύσης λήφθηκε ο μέσος όρος για την σκληρότητα (Film Burst Strength) και την ευθραυστότητα (Distance at Burst) για τις 2-3 επαναλήψεις για καθένα από τα 13 διαφορετικά είδη φιλμ που μετρήθηκαν στον αναλυτή υφής. Το διάγραμμα του αναλυτή υφής για κάθε δοκιμή θραύσης παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 7 (ενδεικτικά).



Διάγραμμα 7: Ενδεικτικό διάγραμμα δύναμης - χρόνου για δοκιμή θραύσης στον αναλυτή υφής

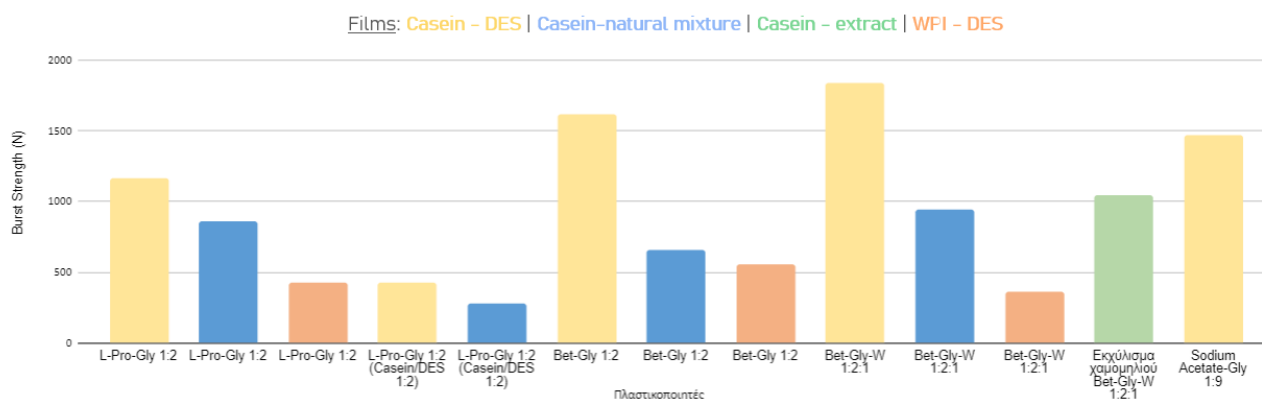
Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται οι τιμές των ιδιοτήτων για κάθε είδος πρωτεϊνικού φιλμ όπως έχουν μεταφραστεί από το αντίστοιχο διάγραμμα.

Πίνακας 28: Μέσοι όροι τιμών της δύναμης θραύσης (Burst Strength) και επιμήκυνσης στη θραύση (Distance at Burst) για κάθε είδος φιλμ κατά την δοκιμή θραύσης

Κωδικός	Πλαστικοποιητής	Burst Strength (N)	Distance at Burst (mm)	Είδος φιλμ
F16	L-Pro-Gly 1:2	1164.835	25.710	Casein-DES
F24		859.187	27.760	Casein - mixture
F38		424.670	26.073	WPI - DES
F17		426.620	26.165	Casein-DES

<b>F25</b>	L-Pro-Gly 1:2 (αναλογία καζεΐνης/NADES 1:2)	281.600	28.290	Casein - mixture
<b>F2</b>	Bet-Gly 1:2	1617.880	23.940	Casein-DES
<b>F21</b>		656.375	26.025	Casein - mixture
<b>F30</b>		551.780	29.830	WPI -DES
<b>F6</b>		1836.490	24.365	Casein-DES
<b>F22</b>	Bet-Gly-W 1:2:1	938.835	25.480	Casein - mixture
<b>F33</b>		361.703	28.140	WPI -DES
<b>F26</b>	NADES (Bet-Gly-W 1:2:1) - Εκχύλισμα χαμομηλιού	1040.415	22.935	Casein - extract
<b>F19</b>	Sodium Acetate- Gly 1:9	1466.015	25.340	Casein-DES

Με βάση τις τιμές του παραπάνω πίνακα κατασκευάστηκαν τα παρακάτω διαγράμματα στηλών με στόχο την διευκόλυνση της σύγκρισης των ιδιοτήτων των φιλμ. Το κίτρινο αφορά φιλμ καζεΐνης με χρήση NADES, το μπλε φιλμ καζεΐνης με χρήση φυσικών μιγμάτων, το πράσινο το φιλμ καζεΐνης με εκχύλισμα χαμομηλιού και το πορτοκαλί τα φιλμ WPI. Όλα τα φιλμ έχουν σχηματιστεί με αναλογία πρωτεΐνης- NADES 1:1 εκτός από τα φιλμ καζεΐνης με πλαστικοποιητή το NADES Pro-Gly 1:2 και το αντίστοιχο με το φυσικό του μίγμα που είχαν αναλογία καζεΐνης-πλαστικοποιητή 1:2.



Διάγραμμα 8: Διάγραμμα στηλών για την μέτρηση της δύναμης θραύσης (Burst Strength) των φιλμ σε σχέση με τον χρησιμοποιούμενο πλαστικοποιητή και χρωματικός διαχωρισμός με βάση το είδος του κάθε φιλμ

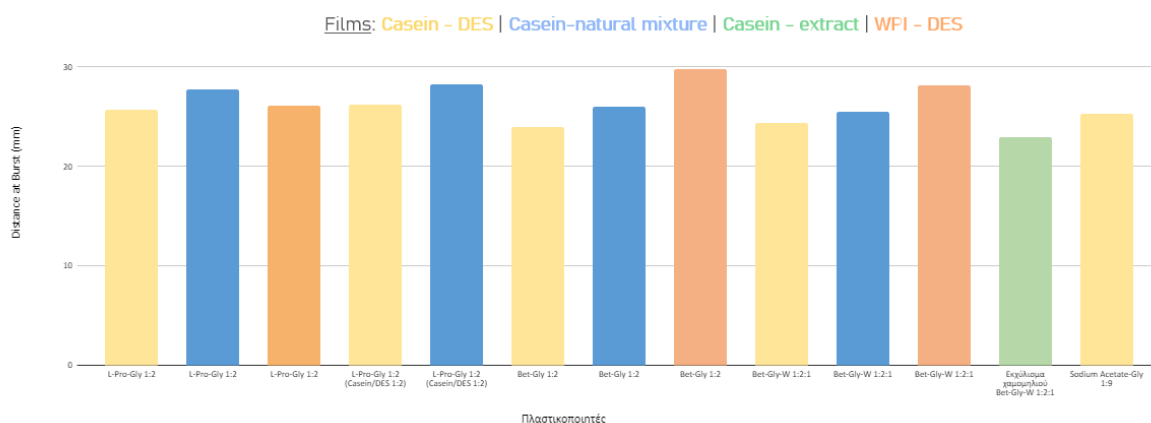
Σχετικά με τις μετρήσεις δύναμης θραύσης των φιλμ από το διάγραμμα στηλών (Διάγραμμα 8) φαίνεται ότι για τους ίδιους διαλύτες, τα φιλμ καζεΐνης με πλαστικοποιητή DES παρουσιάζουν μεγαλύτερη σκληρότητα σε σχέση με τα φιλμ καζεΐνης με πλαστικοποιητή τα φυσικά μίγματα των αντίστοιχων DES καθώς και συγκριτικά με τα φιλμ WPI.

Το φιλμ καζεΐνης με πλαστικοποιητή το NADES-εκχύλισμα χαμομηλιού παρουσιάζει υψηλότερες τιμές υποδεικνύοντας μεγαλύτερη σκληρότητα συγκριτικά τόσο με τα φιλμ καζεΐνης που προήλθαν από χρήση φυσικών μιγμάτων όσο και με τα φιλμ WPI. Επομένως, η τάση της σκληρότητας είναι διακριτή για όλους τους πλαστικοποιητές και διαφορετικά είδη φιλμ.

Συγκρίνοντας την σκληρότητα των φιλμ καζεΐνης-DES, παρατηρείται ότι πιο σκληρό φιλμ είναι αυτό που περιέχει DES Bet-Gly-W 1:2:1 σε αναλογία καζεΐνης-πλαστικοποιητή 1:1 ενώ το λιγότερο σκληρό είναι αυτό που έχει διπλάσια αναλογία DES, δηλαδή Pro-Gly 1:2 σε αναλογία καζεΐνης-πλαστικοποιητή 1:2. Το φιλμ φιλμ καζεΐνης-DES με Pro-Gly 1:2 σε αναλογία καζεΐνης-πλαστικοποιητή 1:1 παρουσιάζει υψηλότερη τιμή δύναμη θραύσης επομένως η σκληρότητα του φιλμ αυξάνεται με την μείωση της αναλογίας καζεΐνης-πλαστικοποιητή.

Συγκρίνοντας την δύναμη θραύσης των φιλμ καζεΐνης-φυσικών μιγμάτων, παρατηρείται ότι πιο σκληρό φιλμ είναι αυτό που περιέχει το φυσικό μίγμα Bet-Gly-W 1:2:1 ενώ το λιγότερο σκληρό είναι πάλι το αυτό που περιέχει Pro-Gly 1:2 σε αναλογία καζεΐνης-πλαστικοποιητή 1:2. Επομένως, για τα φιλμ καζεΐνης υπάρχει η ίδια τάση σκληρότητας των φιλμ ανάλογα με τα συστατικά του διαλύτη που χρησιμοποιείται είτε ως DES είτε ως φυσικό μίγμα.

Αντιθέτως, στα φιλμ πρωτεϊνών ορού γάλακτος πιο σκληρό είναι αυτό που περιέχει DES Bet-Gly 1:2 ενώ λιγότερο σκληρό αυτό με το DES Bet-Gly-W 1:2:1. Έτσι, η αλλαγή της πρωτεΐνης φαίνεται να επηρεάζει την σκληρότητα της για τον ίδιο διαλύτη. Για τα φιλμ καζεΐνης με πλαστικοποιητή DES Bet-Gly-W 1:2:1 φαίνεται το φιλμ με εκχύλισμα χαμομηλιού να έχει λίγο μειωμένη σκληρότητα σε σχέση με το φιλμ χωρίς εκχύλισμα όμως μεγαλύτερα από τα αντίστοιχα φιλμ με φυσικό μίγμα ή με WPI.



Διάγραμμα 9: Διάγραμμα στηλών για την μέτρηση επιμήκυνσης στη θραύση (Distance at Burst) των φιλμ σε σχέση με τον χρησιμοποιούμενο πλαστικοποιητή και χρωματικός διαχωρισμός με βάση το είδος του κάθε φιλμ

Σχετικά με την επιμήκυνση στη θραύση που αφορά την ευθραυστότητα των φιλμ από το διάγραμμα στηλών (Διάγραμμα 9) φαίνεται ότι τα φιλμ καζεΐνης με πλαστικοποιητή NADES είναι περισσότερο εύθραυστα σε σχέση με τα φιλμ καζεΐνης με πλαστικοποιητή τα αντίστοιχα φυσικά μίγματα αυτών και με τα φιλμ WPI.

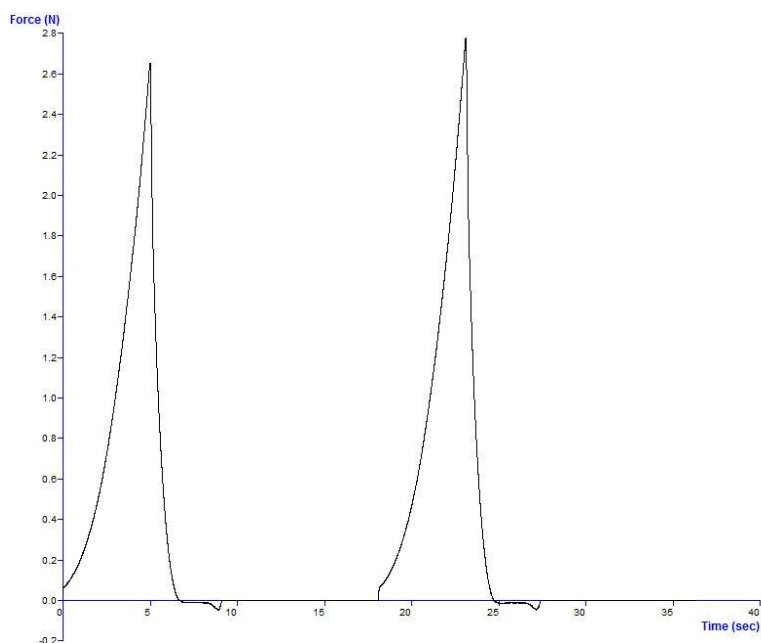
Το φιλμ καζεΐνης που παρασκευάστηκε με τη χρήση του εκχυλίσματος χαμομηλιού που προήλθε από τον NADES Bet-Gly-W 1:2:1 είναι πιο εύθραυστο σε σχέση με τα υπόλοιπα φιλμ, πιθανώς κάτι που οφείλεται στο σύστημα που αναπτύσσεται εντός του δικτύου δεσμών υδρογόνου του NADES και των εκχυλιζόμενων ενώσεων από το χαμομήλι.

Για τα φιλμ με πλαστικοποιητή Pro-Gly 1:2, φαίνεται ότι τα λιγότερο εύθραυστα φιλμ είναι αυτά των φυσικών μιγμάτων ενώ για τα φιλμ με Bet:Gly 1:2 και Bet:Gly:W 1:2:1, τα λιγότερο εύθραυστα φιλμ είναι τα WPI.

Συγκρίνοντας την ευθραυστότητα των φιλμ καζεΐνης με χρήση NADES, παρατηρείται ότι οι διαφορές είναι πολύ μικρές καθώς οι τιμές κυμαίνονται κοντά μεταξύ τους. Το ίδιο ισχύει και για τα φιλμ καζεΐνης με πλαστικοποιητή τα φυσικά μίγματα των αντίστοιχων NADES και με τα φιλμ WPI. Για τα φιλμ καζεΐνης με πλαστικοποιητή NADES Bet-Gly-W 1:2:1 φαίνεται το φιλμ με εκχύλισμα χαμομηλιού να έχει αυξημένη ευθραυστότητα σε σχέση με το φιλμ χωρίς εκχύλισμα, το αντίστοιχο φιλμ με φυσικό μίγμα και με WPI.

### 3.5.4.2 Δοκιμή συμπίεσης

Κατά τη δοκιμή συμπίεσης λήφθηκε ο μέσος όρος για την συνεκτικότητα, ελαστικότητα, ανθεκτικότητα και προσκολλησιμότητα για τις 2-3 επαναλήψεις για καθένα από τα 13 διαφορετικά είδη φιλμ που μετρήθηκαν στον αναλυτή υφής. Το διάγραμμα του αναλυτή υφής για κάθε δοκιμή συμπίεσης παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 10 (ενδεικτικά).



Διάγραμμα 10 : Ενδεικτικό διάγραμμα δύναμης - χρόνου για δοκιμή συμπίεσης στον αναλυτή υφής

Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται οι τιμές των ιδιοτήτων για κάθε είδος πρωτεϊνικού φιλμ όπως έχουν μεταφραστεί με βάση κατάλληλη μακροεντολή από το αντίστοιχο διάγραμμα.

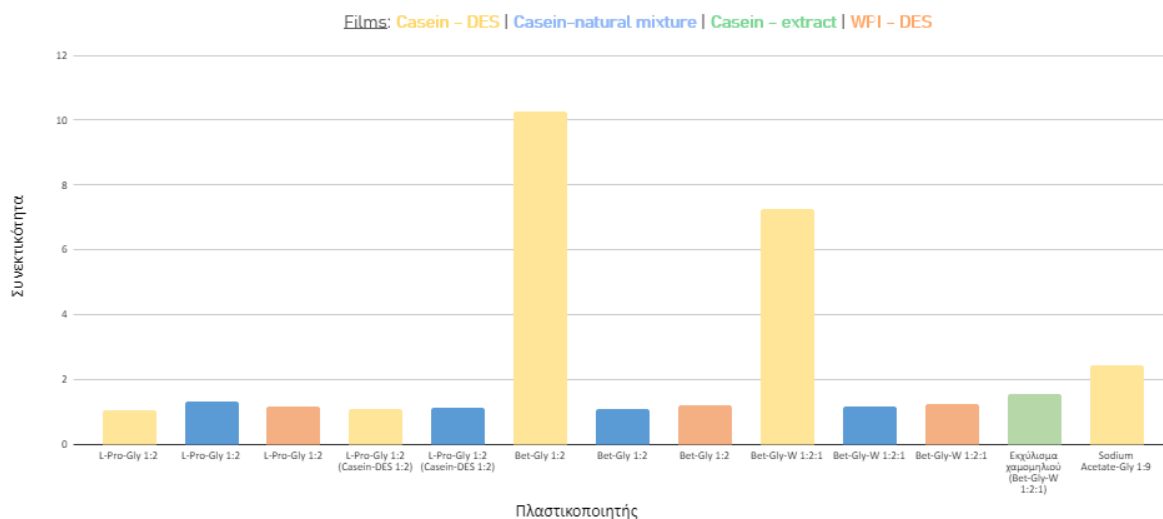
Πίνακας 29: Μέσοι όροι τιμών συνεκτικότητας (Cohesiveness), ελαστικότητας (Elasticity), ανθεκτικότητας (Resilience) και προσκολλησιμότητας (Adhesiveness) για κάθε είδος φιλμ κατά την δοκιμή συμπίεσης

Κωδικός	Πλαστικοποιητής	Συνεκτικότητα	Ελαστικότητα	Ανθεκτικότητα	Προσκολλησιμότητα	Είδος φιλμ
F16	L-Pro-Gly 1:2	1.057	1.035	0.244	0.044	Casein-DES
F24		1.317	1.129	0.233	0.075	Casein - mixture
F38		1.190	1.113	0.243	0.027	WPI-DES



F17	L-Pro-Gly 1:2 (Casein/DES 1:2)	1.107	1.060	0.284	0.096	Casein-DES
F25		1.123	1.086	0.294	0.088	Casein - mixture
F2	Bet-Gly 1:2	10.252	1.597	0.185	0.008	Casein-DES
F21		1.101	1.066	0.239	0.044	Casein - mixture
F30		1.203	1.109	0.266	0.031	WPI-DES
F6	Bet-Gly-W 1:2:1	7.258	1.489	0.215	0.011	Casein-DES
F22		1.185	1.094	0.227	0.059	Casein - mixture
F33		1.263	1.119	0.269	0.036	WPI-DES
F26	Εκχύλισμα χαμομηλιού (Bet- Gly-W 1:2:1)	1.566	1.180	0.223	0.079	Casein - extract
F19	Sodium Acetate- Gly 1:9	2.441	1.310	0.246	0.015	Casein-DES

Με βάση τις τιμές του παραπάνω πίνακα κατασκευάστηκαν τα παρακάτω διαγράμματα στηλών (Διαγράμματα 11-14) με στόχο την διευκόλυνση της σύγκρισης των ιδιοτήτων των φιλμ. Το κίτρινο αφορά φιλμ καζεΐνης με χρήση NADES, το μπλε φιλμ καζεΐνης με χρήση φυσικών μιγμάτων, το πράσινο το φιλμ καζεΐνης με εκχύλισμα χαμομηλιού και το πορτοκαλί τα φιλμ WPI. Όλα τα φιλμ έχουν σχηματιστεί με αναλογία πρωτεΐνης- NADES 1:1 εκτός από τα φιλμ καζεΐνης με πλαστικοποιητή το NADES Pro-Gly 1:2 και το αντίστοιχο με το φυσικό του μίγμα που είχαν αναλογία καζεΐνης-πλαστικοποιητή 1:2.

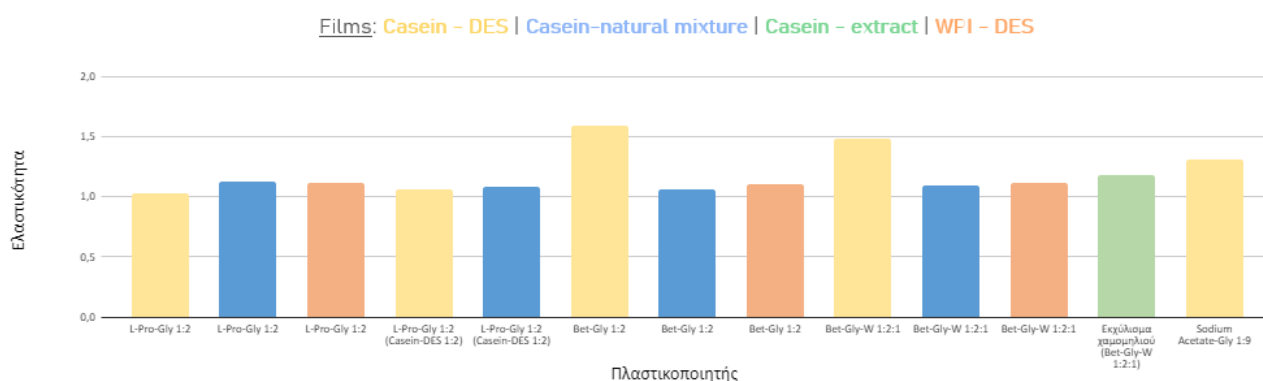


Διάγραμμα 11: Διάγραμμα στηλών για την μέτρηση συνεκτικότητας των φιλμ σε σχέση με τον χρησιμοποιούμενο πλαστικοποιητή και χρωματικός διαχωρισμός με βάση το είδος του κάθε φιλμ

Συγκρίνοντας την συνεκτικότητα των φιλμ στο Διάγραμμα 11 παρατηρείται μια σημαντική διαφορά των φιλμ καζεΐνης με πλαστικοποιητή τα NADES Bet:Gly 1:2 και Bet:Gly:W 1:2:1 σε σύγκριση με τα υπόλοιπα φιλμ καθώς αυτά τα δύο είναι τα πιο συνεκτικά. Επιπλέον, στα φιλμ με διαλύτη Bet:Gly 1:2 και Bet:Gly:W 1:2:1 παρατηρείται ότι τα φιλμ καζεΐνης με φυσικό μίγμα και τα φιλμ WPI-DES έχουν σχεδόν ίση συνεκτικότητα.

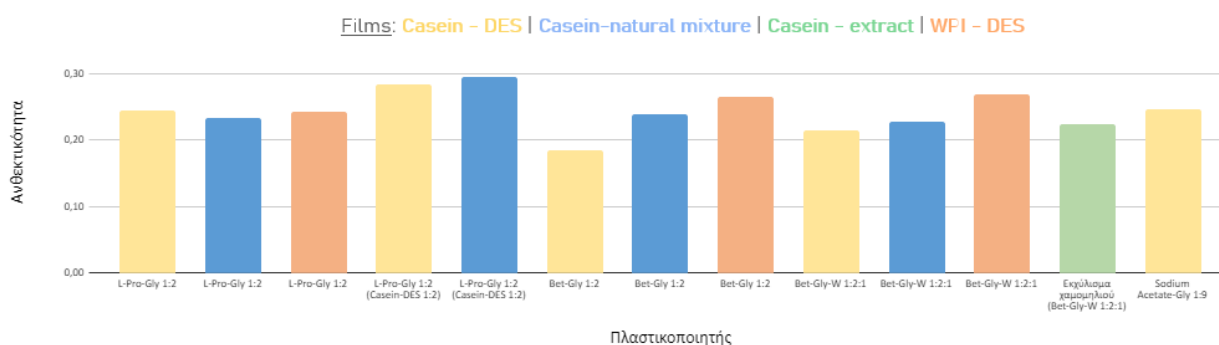
Όσον αφορά στο φιλμ καζεΐνης με πλαστικοποιητή το εκχύλισμα χαμομηλιού που προέκυψε έπειτα από εκχύλιση με χρήση του διαλύτη Bet-Gly-W 1:2:1, παρατηρείται πως έχει σημαντικά χαμηλότερη συνεκτικότητα σε σχέση με το αντίστοιχο φιλμ με σκέτο NADES Bet-Gly-W 1:2:1, κάτι που πιθανόν να οφείλεται στις εκχυλιζόμενες ενώσεις που παρεμβάλλονται εντός του δικτύου δεσμών υδρογόνου του NADES.

Στα φιλμ με διαλύτη που περιέχει προλίνη-γλυκερόλη, δηλαδή είτε NADES Pro:Gly 1:2 είτε το αντίστοιχο φυσικό μίγμα, παρατηρείται ότι όλες οι τιμές συνεκτικότητας είναι πολύ μικρές και δεν φαίνεται να επηρεάζονται από το είδος του φιλμ ή την συγκέντρωση του διαλύτη σε αυτό.



Διάγραμμα 12 : Διάγραμμα στηλών για την μέτρηση ελαστικότητας των φιλμ σε σχέση με τον χρησιμοποιούμενο πλαστικοποιητή και χρωματικός διαχωρισμός με βάση το είδος του κάθε φιλμ

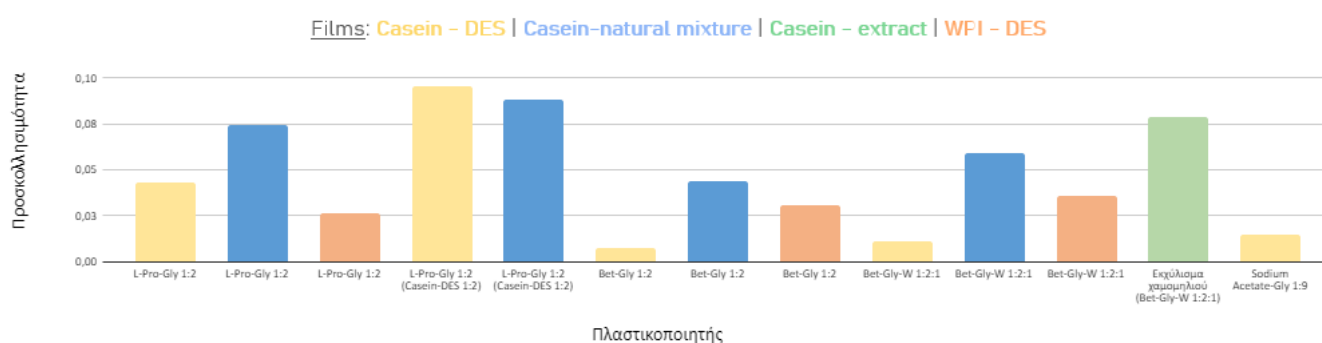
Όσον αφορά την ελαστικότητα των φιλμ από το Διάγραμμα 12 δεν παρατηρείται κάποια διακριτή τάση σε σχέση με το είδος του φιλμ ή το είδος του διαλύτη. Τα φιλμ με τη μεγαλύτερη ελαστικότητα είναι αυτά της καζεΐνης με πλαστικοποιητή DES με συστατικό την βεταΐνη. Παρατηρείται ότι όλα τα φιλμ με πλαστικοποιητές φυσικά μίγματα έχουν πολύ κοντινή ελαστικότητα όπως και τα φιλμ WPI. Επιπλέον, παρατηρείται ότι όλα τα φιλμ που περιέχουν ως συστατικό του πλαστικοποιητή τους την προλίνη έχουν παρόμοια ελαστικότητα επομένως φαίνεται ότι δεν επηρεάζεται από την περιεκτικότητα του διαλύτη και το είδος του φιλμ. Το φιλμ καζεΐνης με εκχύλισμα χαμομηλιού και DES Bet-Gly-W 1:2:1 έχει λίγο μικρότερη ελαστικότητα από το αντίστοιχο φιλμ καζεΐνης με DES και πολύ κοντινή με το φιλμ καζεΐνης με το αντίστοιχο φυσικό μίγμα και το φιλμ WPI με το ίδιο DES.



Διάγραμμα 13 : Διάγραμμα στηλών για την μέτρηση ανθεκτικότητας των φιλμ σε σχέση με τον χρησιμοποιούμενο πλαστικοποιητή και χρωματικός διαχωρισμός με βάση το είδος του κάθε φιλμ

Από το παραπάνω διάγραμμα 13 φαίνεται ότι μεγαλύτερη ανθεκτικότητα έχουν τα φιλμ καζεΐνης με πλαστικοποιητή L-Pro-Gly 1:2 σε αναλογία καζεΐνης-πλαστικοποιητή 1:2. Ακόμη, τα φιλμ πρωτεϊνών ορού γάλακτος έχουν με μικρή διαφορά από τα υπόλοιπα, τη μεγαλύτερη ανθεκτικότητα για τον ίδιο πλαστικοποιητή σε σχέση με τα αντίστοιχα φιλμ καζεΐνης. Η ανθεκτικότητα για τα φιλμ καζεΐνης είναι παρόμοια είτε έχει χρησιμοποιηθεί ως πλαστικοποιητής NADES είτε το φυσικό του μίγμα.

Για τα φιλμ που περιέχουν NADES ή φυσικό μίγμα με κύριο συστατικό την προλίνη, φαίνεται για την ίδια αναλογία πρωτεΐνης-πλαστικοποιητή τα φιλμ δεν διαφέρουν. Για παράδειγμα, τα φιλμ καζεΐνης με πλαστικοποιητή NADES Pro:Gly 1:2 σε αναλογία καζεΐνης-πλαστικοποιητή 1:2 έχουν σχεδόν ίδια ανθεκτικότητα με τα αντίστοιχα φιλμ με φυσικό μίγμα. Αντίθετα, για τα φιλμ που περιέχουν πλαστικοποιητή με βασικό συστατικό την βεταΐνη, φαίνεται να υπάρχει η ίδια τάση αυξανόμενης ανθεκτικότητας με αύξουσα σειρά



Διάγραμμα 14: Διάγραμμα στηλών για την μέτρηση προσκολλησιμότητας των φιλμ σε σχέση με τον χρησιμοποιούμενο πλαστικοποιητή και χρωματικός διαχωρισμός με βάση το είδος του κάθε φιλμ

τα φιλμ Casein - DES, Casein - natural mixture, WPI - DES. Επιπλέον, το φιλμ καζεΐνης με πλαστικοποιητή το εκχύλισμα χαμομηλιού που προέκυψε έπειτα από εκχύλιση με χρήση του διαλύτη Bet-Gly-W 1:2:1 έχει σχεδόν ίση ανθεκτικότητα με το αντίστοιχο φιλμ καζεΐνης με σκέτο NADES Bet-Gly-W 1:2:1.

Όσον αφορά την προσκολλησιμότητα των φιλμ (Διάγραμμα 14) φαίνεται ότι μεγαλύτερη έχουν τα φιλμ καζεΐνης με πλαστικοποιητή L-Pro-Gly 1:2 με αναλογία καζεΐνης-NADES 1:2. Τα φιλμ WPI έχουν χαμηλή και παρόμοια προσκολλησιμότητα ανεξαρτήτως πλαστικοποιητή. Επιπλέον, τα φιλμ καζεΐνης με πλαστικοποιητή DES Bet-Gly 1:2, Bet-Gly-W 1:2:1 και Sodium Acetate-Gly 1:9 έχουν πάρα πολύ μικρή προσκολλησιμότητα. Αντίθετα, τα φιλμ καζεΐνης με πλαστικοποιητή φυσικό μίγμα Bet-Gly 1:2 ή Bet-Gly-W 1:2:1 έχουν μεγαλύτερη προσκολλησιμότητα από τα αντίστοιχα φιλμ WPI ή καζεΐνης με χρήση NADES.

Το φιλμ καζεΐνης με πλαστικοποιητή το εκχύλισμα χαμομηλιού που προέκυψε έπειτα από εκχύλιση με χρήση του διαλύτη Bet-Gly-W 1:2:1 έχει μεγαλύτερη προσκολλησιμότητα από όλα τα φιλμ με διαλύτη Bet-Gly-W 1:2:1 είτε ως NADES είτε ως απλό φυσικό μίγμα.

Γενικά, παρατηρήθηκε σε συμφωνία με τα βιβλιογραφικά δεδομένα [1], ότι η αύξηση της περιεκτικότητας σε πλαστικοποιητή απέδωσε λιγότερο σκληρά και πιο εύκαμπτα φιλμ.

Σε μια πρώτη προσπάθεια εκτίμησης της επίδρασης του μοριακού βάρους του πλαστικοποιητή στην δημιουργία και στις ιδιότητες των φιλμ, παρατηρείται ότι ο πλαστικοποιητής με το μικρότερο μοριακό βάρος (Betaine:Glycerol:Water 1:2:1) δίνει φιλμ

με μεγάλη διαπερατότητα υδρατμών, σκληρότητα και ευθραυστότητα ενώ ο διαλύτης με το μεγαλύτερο μοριακό βάρος (Betaine:Glycerol 1:2) δίνει φιλμ με ακόμη μεγαλύτερη διαπερατότητα υδρατμών αλλά παρόμοια σκληρότητα και ευθραυστότητα. Επομένως, δεν παρατηρείται κάποια συσχέτιση μοριακού βάρους και επιτυχίας σχηματισμού του φιλμ όπως αναφέρεται βιβλιογραφικά <sup>[14]</sup> καθώς οι βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες έχουν παρόμοια δράση που δεν εξαρτάται από το μοριακό τους βάρος αλλά από τους δεσμούς που σχηματίζει ο εκάστοτε πλαστικοποιητής με την πρωτεΐνη.

Στη συνέχεια, με μια αρχική εκτίμηση του πόσο επηρεάζει η πολικότητα του πλαστικοποιητή τον επιτυχή σχηματισμό και τις ιδιότητες των πρωτεϊνικών φιλμ, παρατηρείται ότι ο πλαστικοποιητής με τη μεγαλύτερη πολικότητα (Sodium acetate-Glycerol 1:9) δεν σχηματίζει εύκολα φιλμ καθώς δεν οδήγησε στη δημιουργία φιλμ WPI με χρήση NADES ή καζεΐνης με χρήση φυσικών μιγμάτων. Παρόλα αυτά σχηματίστηκαν φιλμ καζεΐνης με μικρή διαπερατότητα υδρατμών, μεγάλης σκληρότητας και ευθραυστότητας. Ο πλαστικοποιητής με τη μικρότερη πολικότητα (Betaine:Glycerol 1:2) δίνει φιλμ με ακόμη μεγαλύτερη διαπερατότητα υδρατμών αλλά παρόμοια σκληρότητα και ευθραυστότητα. Ακόμα, ο πλαστικοποιητής με εξίσου μικρή πολικότητα (L-Proline:Glycerol 1:2) δίνει φιλμ με μικρή διαπερατότητα υδρατμών, χαμηλής σκληρότητας και υψηλής ευθραυστότητας. Επομένως, παρόλο που αναμένονταν οι πλαστικοποιητές με μικρή πολικότητα να είναι λιγότερο αποτελεσματικοί εξαιτίας της μικρής τους συμμετοχής στους δεσμούς υδρογόνου <sup>[14]</sup>, δεν παρατηρείται διακριτή τάση πολικότητας και επιτυχίας σχηματισμού των φιλμ.

### 3.5.5 Φασματοσκοπία υπερύθρου FT-IR (ATR)

Η φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier και τεχνική εξασθενημένης ολικής ανάκλασης (ATR) έχει ως στόχο τον δομικό χαρακτηρισμό των φιλμ και τη σύγκριση των φασμάτων τους. Θα παρατηρηθούν αλληλεπίδρασης του είδους της πρωτεΐνης και των διαφορετικών πλαστικοποιητών στα φιλμ και οι μεταξύ τους διαφορές. Έτσι, λήφθηκε το φάσμα διαπερατότητας στο εύρος 4000-400 cm<sup>-1</sup> για τα φιλμ καζεΐνης F2, F6, F16, F17, F19, F21, F22, F23, F24, F25, F26, F28 και για τα φιλμ WPI F30, F33, F35, F38, F40. Στους παρακάτω πίνακες (Πίνακες 30-32) παρουσιάζονται οι κύριες χαρακτηριστικές κορυφές απορρόφησης των FTIR φασμάτων των φιλμ.

Πίνακας 30: Απόδοση των χαρακτηριστικότερων κορυφών απορρόφησης των FTIR φασμάτων των υπό εξέταση φιλμ καζεΐνης με χρήση NADES, εκχύλισμα χαμομηλιού και γλυκερόλη

Είδος φιλμ	Καζεΐνη - NADES					Καζεΐνη - Γλυκερόλη	Καζεΐνη - NADES-εκχύλισμα
Κωδικός/ Πλαστικοποιητής	F16/ Pro-Gly 1:2 (καζεΐνη /NADES 1:1)	F17/ Pro-Gly 1:2 (καζεΐνη /NADES 1:2)	F2/ Bet-Gly 1:2	F6/ Bet-Gly-W 1:2:1	F19/ Sodium Acetate-Gly 1:9	F28 / Gly	F26 / NADES (Bet-Gly-W 1:2:1) - Εκχύλισμα χαμομηλιού
Είδος δόνησης*/ δεσμός	cm <sup>-1</sup>						
<b>ν (O-H)</b>	3275	3275	3278	3278	3278	3275	3278

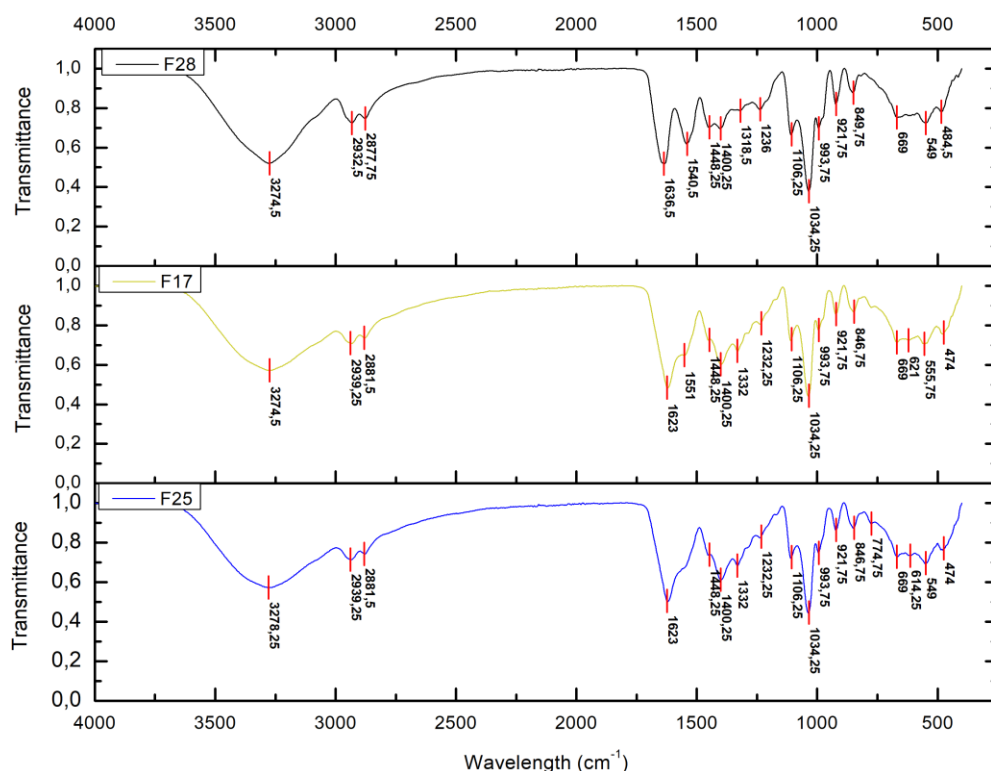
$\nu_{as}(\text{C-H}), \nu_{as}(-\text{CH}_2)$	2926	2939	2937	2929	2933	2933	2936
$\nu_s(\text{C-H}), \nu_s(-\text{CH}_2)$	2875	2882	2878	2878	2875	2878	2878
$\nu(\text{C=O})$	1623	1623	1640	1623	1640	1637	1626
$\delta(\text{N-H})$	1547	#	1544	1544	1545	1541	1541
$\nu_s(\text{COO}^-)$	1397	1400	1403	1394	1404	1400	1394
$\nu_s(-\text{CH}_3)$ σε 3οταγή αμίνη	1329	1332	#	1332	#	#	1332
$\nu(\text{C-N})$	1038	1034	1034	1041	1038	1034	1038

\*  $\nu$ -τάση,  $\nu_s$ -συμμετρική τάση,  $\nu_{as}$ -ασύμμετρη τάση,  $\delta$ -κάμψη, #-δεν παρατηρήθηκε

Πίνακας 31: Απόδοση των χαρακτηριστικότερων κορυφών απορρόφησης των FTIR φασμάτων των υπό εξέταση φιλμ καζεΐνης με πλαστικοποιητή τα φυσικά μίγματα

Κωδικός/ Πλαστικοποιητής	F24/ Pro-Gly 1:2 (καζεΐνη /NADES 1:1)	F25/ Pro-Gly 1:2 (καζεΐνη /NADES 1:2)	F21/ Bet-Gly 1:2	F22 / Bet-Gly-W 1:2:1	F23/ Sodium Acetate-Gly 1:9
<b>Είδος δόνησης*/ δεσμός</b>	<b>cm<sup>-1</sup></b>				
$\nu(\text{O-H})$	3282	3278	3275	3278	3275
$\nu_{as}(\text{C-H}), \nu_{as}(-\text{CH}_2)$	2943	2939	2937	2932	2933
$\nu_s(\text{C-H}), \nu_s(-\text{CH}_2)$	2879	2882	2878	2877	2878
$\nu(\text{C=O})$	1626	1623	1640	1626	1637
$\delta(\text{N-H})$	1550	#	1544	1544	1541
$\nu_s(\text{COO}^-)$	1403	1401	1403	1394	1404
$\nu_s(-\text{CH}_3)$ σε 3οταγή αμίνη	1334	1332	#	1332	#
$\nu(\text{C-N})$	1040	1034	1034	1038	1038

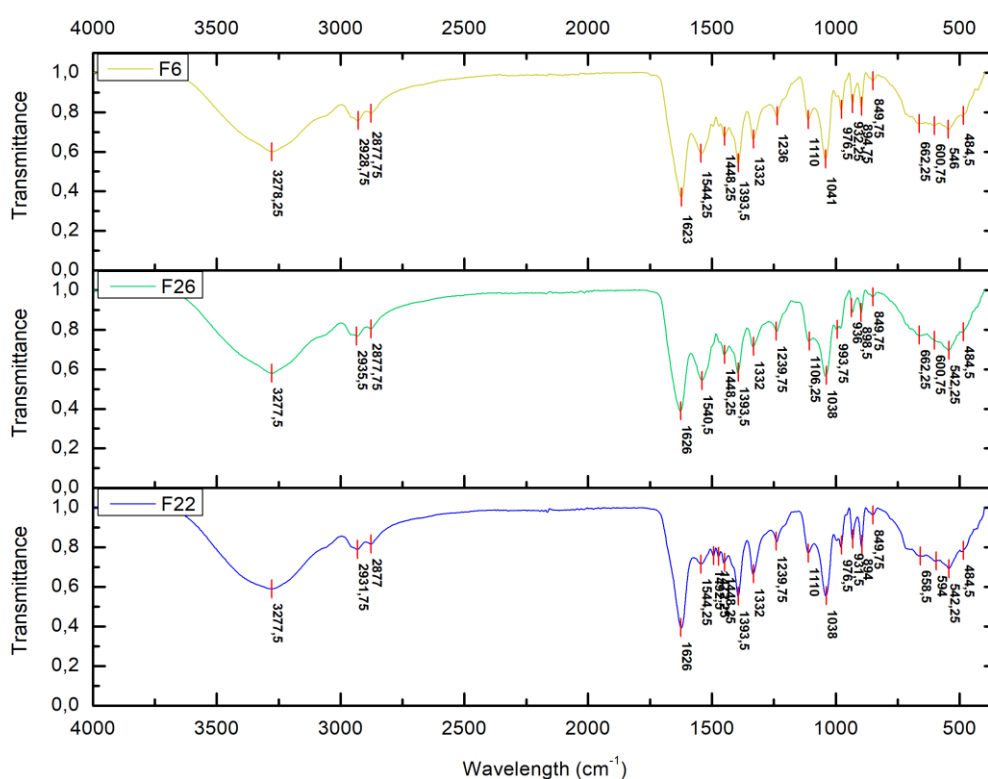
\*  $\nu$ -τάση,  $\nu_s$ -συμμετρική τάση,  $\nu_{as}$ -ασύμμετρη τάση,  $\delta$ -κάμψη, #-δεν παρατηρήθηκε



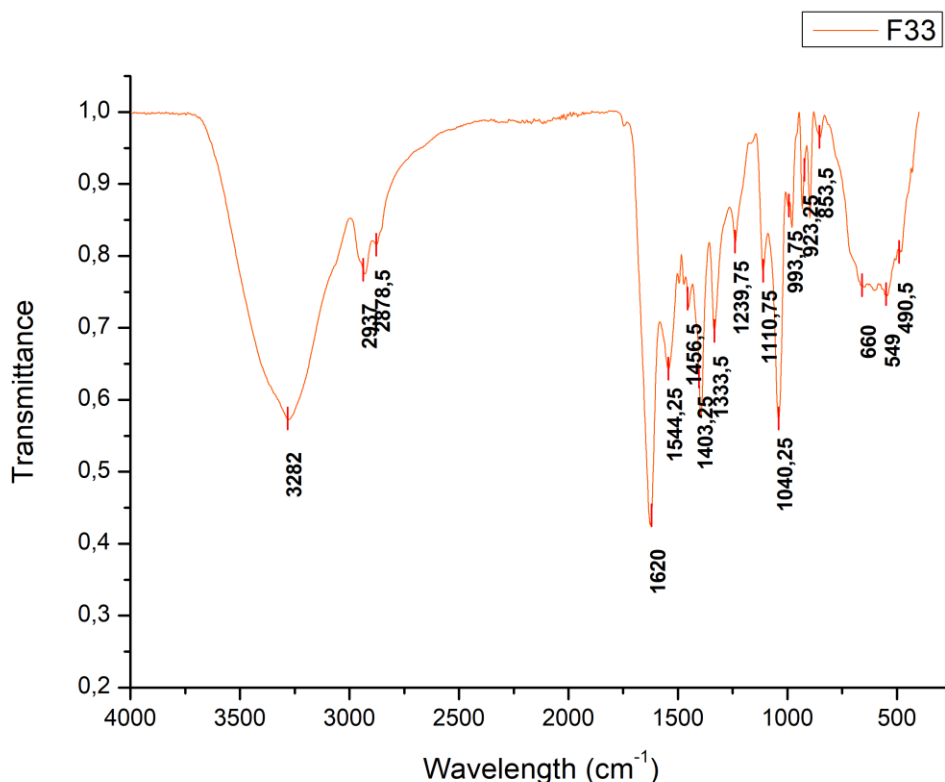
Σχήμα 9: Σύγκριση φασμάτων FTIR (ATR) των φιλμ καζεΐνης με πλαστικοποιητή γλυκερόλη (reference) (F28), DES Pro-Gly 1:2 (F17) και φυσικό μίγμα Pro-Gly 1:2 (F25) σε αναλογία Casein-πλαστικοποιητή 1:2

Στο φάσμα FTIR του φιλμ αναφοράς που παρασκευάστηκε από καζεΐνη με συμβατικό πλαστικοποιητή τη γλυκερόλη (F28 – Σχήμα 9), αρχικά στο εύρος κυματάριθμων 3100–3500 $\text{cm}^{-1}$  και πιο συγκεκριμένα στα 3275 $\text{cm}^{-1}$ , εμφανίζεται μια ευρεία κορυφή που αποδίδεται σε δόνηση τάσης των υδροξυλομάδων<sup>[23][36]</sup> που βρίσκονται τόσο στην καζεΐνη όσο και στην γλυκερόλη. Στους 2933 $\text{cm}^{-1}$  και 2878 $\text{cm}^{-1}$  κυματαριθμούς, εμφανίζονται κορυφές που αντιστοιχούν στις ασύμμετρες και συμμετρικές δονήσεις τάσης των δεσμών C-H και -CH<sub>2</sub> αντιστοίχως<sup>[23][36][37]</sup>. Ακόμα, παρατηρείται η δόνηση τάσης του δεσμού C=O του καρβονυλίου της καζεΐνης με ισχυρή κορυφή στους 1637  $\text{cm}^{-1}$  κυματαριθμούς<sup>[36][37]</sup>. Ακόμα, στα 1541 $\text{cm}^{-1}$  δίνουν κορυφή οι δονήσεις κάμψης του δεσμού N-H<sup>[36]</sup> και στα 1397 $\text{cm}^{-1}$  οι συμμετρικές δονήσεις τάσης του καρβοξυλικού ιόντος -COO<sup>-</sup><sup>[23]</sup> της καζεΐνης. Υψηλής έντασης κορυφή εμφανίζεται στους 1034 $\text{cm}^{-1}$  κυματάριθμους λόγω της δόνησης τάσης του δεσμού C-N στους πεπτιδικούς δεσμούς της καζεΐνης.

Συγκρίνοντας το φάσμα του φιλμ καζεΐνης με πλαστικοποιητή DES Pro-Gly 1:2 (Casein/DES 1:2) (F17 – Σχήμα 9) με το φάσμα του φιλμ αναφοράς (F28) παρατηρείται ότι δεν εμφανίζουν σημαντικές διαφορές στους κυματάριθμους που εκδηλώνονται οι κορυφές. Παρατηρείται, όμως, η έλλειψη κορυφής στο φάσμα του μη συμβατικού φιλμ που να υποδηλώνει την ύπαρξη του δεσμού N-H, πράγμα μη αναμενόμενο δεδομένου της ύπαρξης του δεσμού αυτού στην προλίνη. Επομένως, πιθανή στερεοχημική παρεμπόδιση από τους υπόλοιπους δεσμούς ευθύνεται για την έλλειψη ταυτοποίησης αυτού. Όμοια, στο φάσμα του φιλμ καζεΐνης με πλαστικοποιητή το φυσικό μίγμα DES Pro-Gly 1:2 (Casein/DES 1:2) (F25 – Σχήμα 9) δεν εμφανίζεται κορυφή που να οφείλεται στο δεσμό N-H αλλά δεν φαίνονται διαφορές σε σχέση με την ένταση των υπολοίπων κορυφών και τις χαρακτηριστικές ομάδες στις οποίες αποδίδονται, είτε στη σύγκριση με το φιλμ F17 είτε με το συμβατικό F28.



Σχήμα 10: Σύγκριση φασμάτων FTIR (ATR) για τα φιλμ καζεΐνης με πλαστικοποιητή Bet-Gly-W 1:2:1 ως DES (F6), ως εκχύλισμα χαμομηλιού (F26), ως φυσικό μίγμα (F22)



Σχήμα 11: Φάσμα FTIR (ATR) του φιλμ WPI με πλαστικοποιητή από DES Bet-Gly-W 1:2:1 (F33)

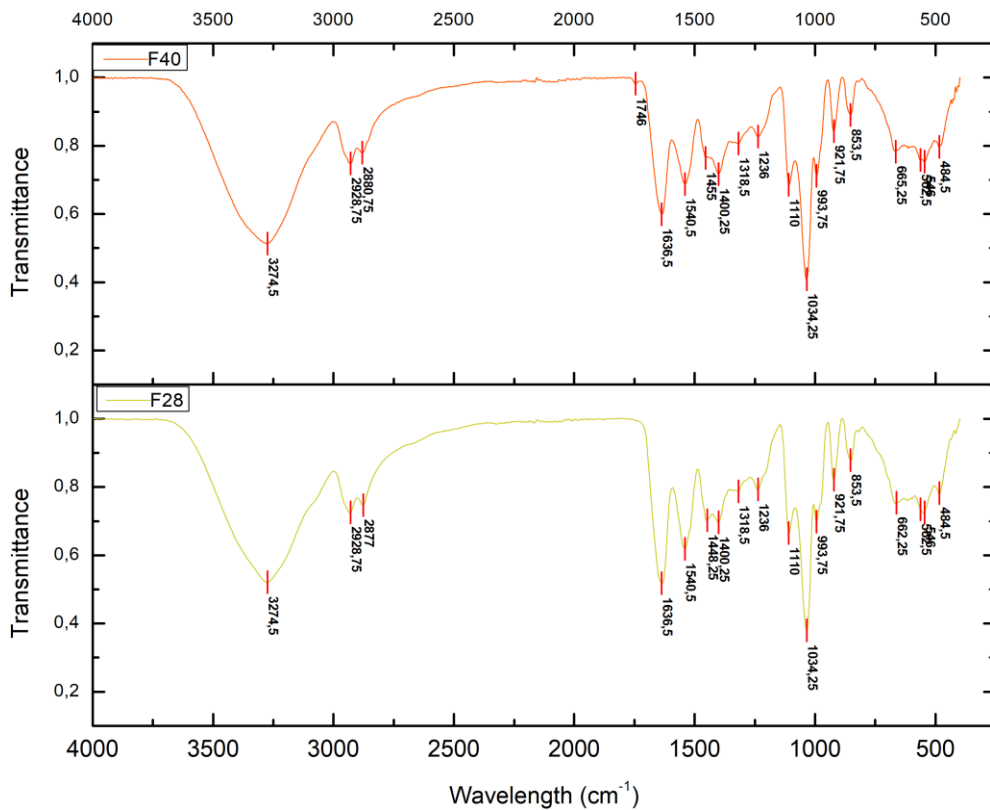
Συγκρίνοντας το φάσμα FTIR του φιλμ καζεΐνης με πλαστικοποιητή DES Bet-Gly-W 1:2:1 (F6 – Σχήμα 10) με το φάσμα του φιλμ αναφοράς (F28) παρατηρείται ότι δεν εμφανίζουν σημαντικές διαφορές στους κυματάριθμους που εκδηλώνονται οι κορυφές. Παρατηρείται, όμως, μειωμένη ένταση στην κορυφή  $3278\text{cm}^{-1}$  που οφείλεται σε δόνηση τάσης των υδροξυλομάδων καθώς η γλυκερόλη είναι σε μικρότερη αναλογία από ότι στο φιλμ αναφοράς. Η κορυφή στα  $1623\text{cm}^{-1}$  όπου παρατηρείται η δόνηση τάσης του δεσμού C=O είναι μεγαλύτερη στο φιλμ που περιέχει βεταΐνη καθώς συνεργεί το καρβονύλιο της, ομοίως και η κορυφή στα  $1394\text{cm}^{-1}$  την οποία ενισχύει το καρβοξυλικό ιόν της βεταΐνης. Όμως, η κορυφή στα  $1041\text{cm}^{-1}$  λόγω της δόνησης τάσης του δεσμού C-N στους πεπτιδικούς δεσμούς της καζεΐνης είναι μικρότερη στο φιλμ που περιέχει βεταΐνη αφού μάλλον η βεταΐνη αλληλεπιδρά με τους δεσμούς της πρωτεΐνης και ο δεσμός C-N της βεταΐνης δεν εμφανίζεται στον ίδιο κυματαριθμό. Στα  $1332\text{cm}^{-1}$  παρατηρείται κορυφή που οφείλεται σε συμμετρική δόνηση τάσης του δεσμού της τριτοταγής αμίνης της βεταΐνης με τα μεθύλια ( $-\text{CH}_3$ )<sup>[36]</sup> η οποία είναι αμελητέα στο φάσμα του συμβατικού φιλμ με γλυκερόλη.

Πίνακας 32: Απόδοση των χαρακτηριστικότερων κορυφών απορρόφησης των FTIR φασμάτων των υπό εξέταση φιλμ WPI με πλαστικοποιητή NADES και γλυκερόλη

Κωδικός/ Πλαστικοποιητής	F33/ Bet- Gly-W 1:2:1	F38/ Pro- Gly 1:2	F30/ Bet-Gly 1:2	F35/ Sodium Acetate- Gly 1:9	F40/ Gly
Είδος δόνησης*/ δεσμός	$\text{cm}^{-1}$				
$\nu$ (O-H)	3282	3277	3277	3281	3275
$\nu_{\text{as}}$ (C-H), $\nu_{\text{as}}$ (-CH <sub>2</sub> )	2937	2937	2925	2926	2929

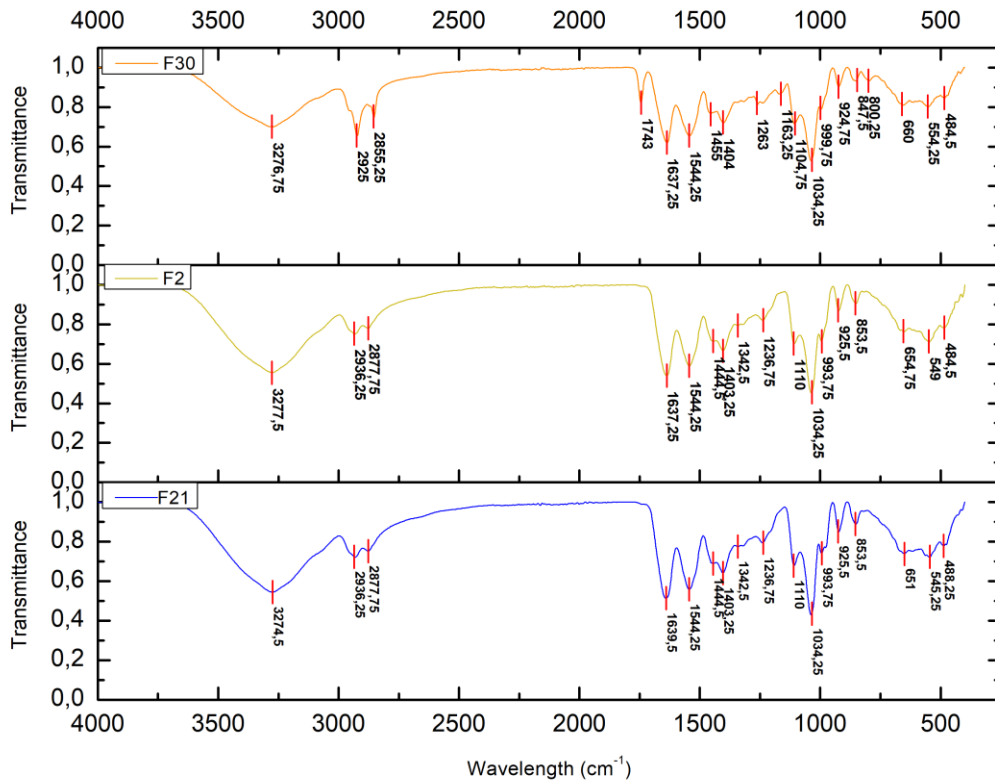


$\nu_s$ (C-H) , $\nu_s$ (-CH <sub>2</sub> )	2879	2879	2855	2850	2881
$\nu$ (C=O)	1620	1626	1637	1637	1637
$\delta$ (N-H)	1544	1544	1544	1541	1541
$\nu_s$ (COO <sup>-</sup> )	1403	1403	1404	1401	1400
$\nu$ (C-N)	1040	1040	1034	1038	1034
* $\nu$ -τάση, $\nu_s$ -συμμετρική τάση, $\nu_{as}$ -ασύμμετρη τάση, $\delta$ -κάμψη, #-δεν παρατηρήθηκε					



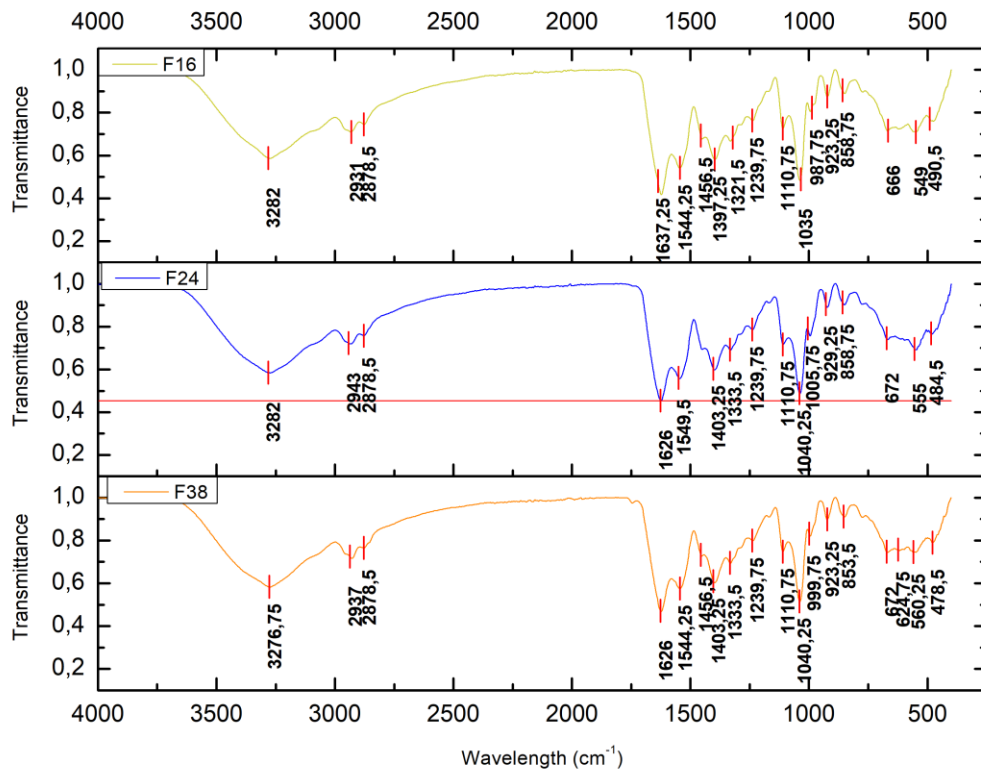
Σχήμα 12: Φάσμα FTIR για τα φιλμ WPI (F40) και καζείνης (F28) με πλαστικοποιητή γλυκερόλη (reference)

Στο φάσμα FTIR του φιλμ αναφοράς που παρασκευάστηκε από WPI με συμβατικό πλαστικοποιητή τη γλυκερόλη (F40 - Σχήμα 12), αρχικά στο εύρος κυματιριθμών 3100-3500cm<sup>-1</sup> και πιο συγκεκριμένα στα 3278cm<sup>-1</sup>, εμφανίζεται μια ευρεία κορυφή που αποδίδεται σε δόνηση τάσης των υδροξυλομάδων<sup>[23][36]</sup> που βρίσκονται τόσο στις πρωτεΐνες ορού γάλακτος όσο και στην γλυκερόλη. Στους 2929cm<sup>-1</sup> και 2881cm<sup>-1</sup> κυματιριθμούς, εμφανίζονται κορυφές που αντιστοιχούν στις ασύμμετρες και συμμετρικές δονήσεις τάσης των δεσμών C-H και -CH<sub>2</sub> αντιστοίχως<sup>[23][36][37]</sup>. Ακόμα, παρατηρείται η δόνηση τάσης του δεσμού C=O του καρβονυλίου της πρωτεΐνης με ισχυρή κορυφή στους 1637 cm<sup>-1</sup> κυματιριθμούς<sup>[36][37]</sup>. Ακόμα, στα 1541cm<sup>-1</sup> δίνουν κορυφή οι δονήσεις κάμψης του δεσμού N-H<sup>[36]</sup> και στα 1400cm<sup>-1</sup> οι συμμετρικές δονήσεις τάσης του καρβοξυλικού ιόντος -COO<sup>-</sup><sup>[23]</sup> της πρωτεΐνης. Υψηλής έντασης κορυφή εμφανίζεται στους 1034cm<sup>-1</sup> κυματάριθμους λόγω της δόνησης τάσης του δεσμού C-N στους πεπτιδικούς δεσμούς των πρωτεϊνών.



Σχήμα 13: Σύγκριση φασμάτων FTIR των φιλμ με πλαστικοποιητή Bet-Gly 1:2 για τα είδη WPI-DES (F30), Casein-DES (F2) και Casein-mixture (F21)

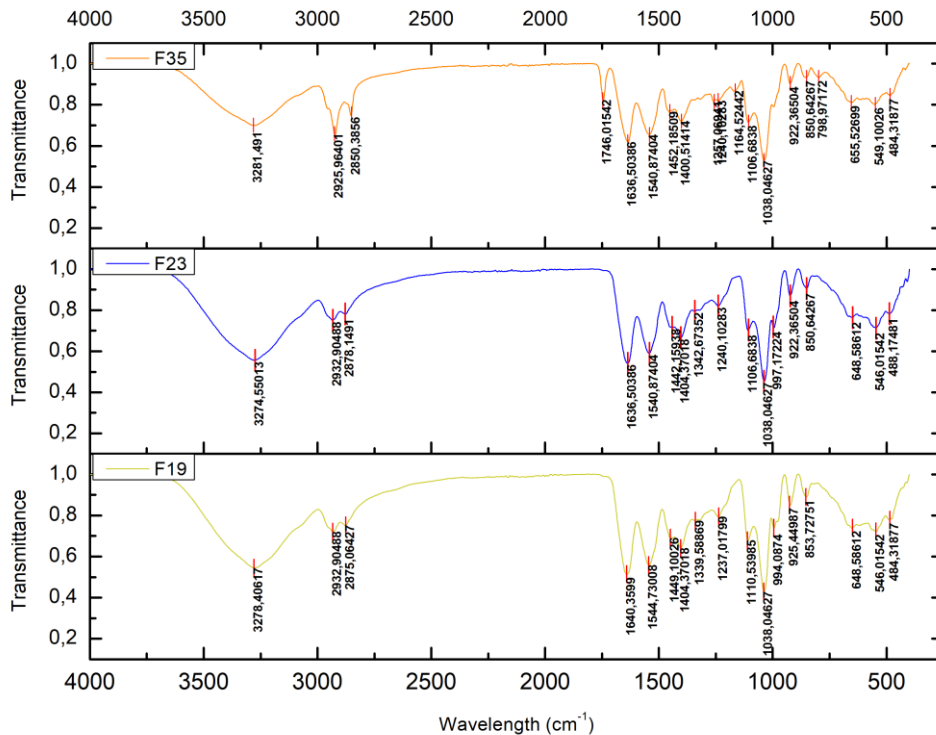
Συγκρίνοντας το φάσμα FTIR του φιλμ καζεΐνης με πλαστικοποιητή DES Bet-Gly 1:2 (F2 – Σχήμα 13) με το φάσμα του φιλμ αναφοράς (F28) παρατηρείται ότι δεν εμφανίζουν σημαντικές διαφορές στους κυματάριθμους που εκδηλώνονται οι κορυφές. Το φάσμα FTIR του φιλμ καζεΐνης με πλαστικοποιητή το φυσικό μίγμα Bet-Gly 1:2 (F21 – Σχήμα 13) είναι σχεδόν πανομοιότυπο με το φάσμα του φιλμ καζεΐνης με πλαστικοποιητή DES Bet-Gly 1:2 επομένως οι κορυφές απορρόφησης του IR δεν επηρεάζονται από την προσθήκη DES ή φυσικού μίγματος στο φιλμ για την περίπτωση του Bet-Gly 1:2. Όμοια και το φιλμ WPI με πλαστικοποιητή DES Bet-Gly 1:2 (F30 – Σχήμα 13) επομένως οι απορροφήσεις των χαρακτηριστικών ομάδων των φιλμ δεν επηρεάζονται από το είδος της πρωτεΐνης για το Bet-Gly 1:2.



Σχήμα 14: Σύγκριση φασμάτων FTIR των φιλμ με πλαστικοποιητή Pro-Gly 1:2 για τα είδη Casein-DES (F16), Casein-mixture (F24) και WPI-DES (F38)

Το φάσμα FTIR του φιλμ καζεΐνης με πλαστικοποιητή DES Pro-Gly 1:2 (F16 - Σχήμα 14) εμφανίζει πολύ κοντινές κορυφές με το φιλμ γλυκερόλης (F28). Παρατηρείται, όμως, στα  $1329\text{cm}^{-1}$  κορυφή που αποδίδεται σε συμμετρική δόνηση τάσης του δεσμού της τριτοταγής αμίνης της βεταΐνης με τα μεθύλια ( $-\text{CH}_3$ )<sup>[36]</sup> η οποία είναι αμελητέα στο φάσμα του συμβατικού φιλμ με γλυκερόλη. Στο φάσμα FTIR του συμβατικού φιλμ παρατηρείται μεγαλύτερη ένταση της κορυφής που αφορά σε δόνηση τάσης των υδροξυλομάδων και μικρότερη ένταση στην κορυφή από τη δόνηση τάσης του δεσμού  $\text{C}=\text{O}$  των καρβονυλίων λόγω της καρβονυλικής ομάδας της προλίνης. Επιπλέον, μεγαλύτερη ένταση έχει η κορυφή που προέρχεται από τη συμμετρική τάση του δεσμού  $\text{C}-\text{N}$  στο συμβατικό φιλμ καζεΐνης με γλυκερόλη ως πλαστικοποιητή.

Συγκρίνοντας το φάσμα FTIR του φιλμ καζεΐνης με πλαστικοποιητή DES Pro-Gly 1:2 (F16 - Σχήμα 14) με το φάσμα του φιλμ καζεΐνης με πλαστικοποιητή το αντίστοιχο φυσικό μίγμα (F24 - Σχήμα 14) και το φάσμα του φιλμ WPI με πλαστικοποιητή το ίδιο NADES (F38 - Σχήμα 14) παρατηρούνται αμελητέες διαφορές στην ένταση των κορυφών και τις χαρακτηριστικές ομάδες στις οποίες αποδίδονται. Επομένως, και σε αυτό το διαλύτη δεν παίζει ρόλο η προσθήκη του ως DES ή ως φυσικό μίγμα στο φιλμ και το είδος της πρωτεΐνης κατά την φασματοσκοπική του ανάλυση σε IR.



Σχήμα 15: Σύγκριση φασμάτων FTIR των φιλμ με πλαστικοποιητή Sodium Acetate-Gly 1:9 για τα είδη WPI-DES (F35), Casein-mixture (F23) και Casein-DES (F19)

Το φάσμα του φιλμ καζεΐνης με πλαστικοποιητή DES Sodium Acetate-Gly 1:9 (F19 – Σχήμα 15) εμφανίζει πολύ κοντινές κορυφές με το φιλμ γλυκερόλης (F28) που αποδίδονται στις ίδιες χαρακτηριστικές ομάδες. Επιπλέον, στο φάσμα FTIR του φιλμ καζεΐνης με πλαστικοποιητή το φυσικό μίγμα Sodium Acetate-Gly 1:9 (F23 – Σχήμα 15) σε σύγκριση με το αντίστοιχο φιλμ με NADES δεν παρατηρούνται διαφορές άξιες σχολιασμού που θα μπορούσαν να δώσουν κάποια στοιχεία για τις διαφορετικές αλληλεπιδράσεις στο φιλμ.

Συγκρίνοντας το φάσμα WPI με πλαστικοποιητή DES Sodium Acetate-Gly 1:9 (F35 – Σχήμα 15) με το αντίστοιχο φιλμ καζεΐνης παρατηρείται ότι οι κορυφές εμφανίζονται στους ίδιους κυματάριθμους για τις αντίστοιχες χαρακτηριστικές ομάδες. Όμως, παρατηρείται χαμηλότερη ένταση στις κορυφές που ταυτοποιούν τις υδροξυλομάδες και τα καρβονύλια και υψηλότερη ένταση στις κορυφές που οφείλονται στις δονήσεις τάσης των δεσμών C-H και -CH<sub>2</sub>.

### 3.6 Διερεύνηση εφαρμογής των φιλμ ως μεμβράνες επικάλυψης τροφίμων

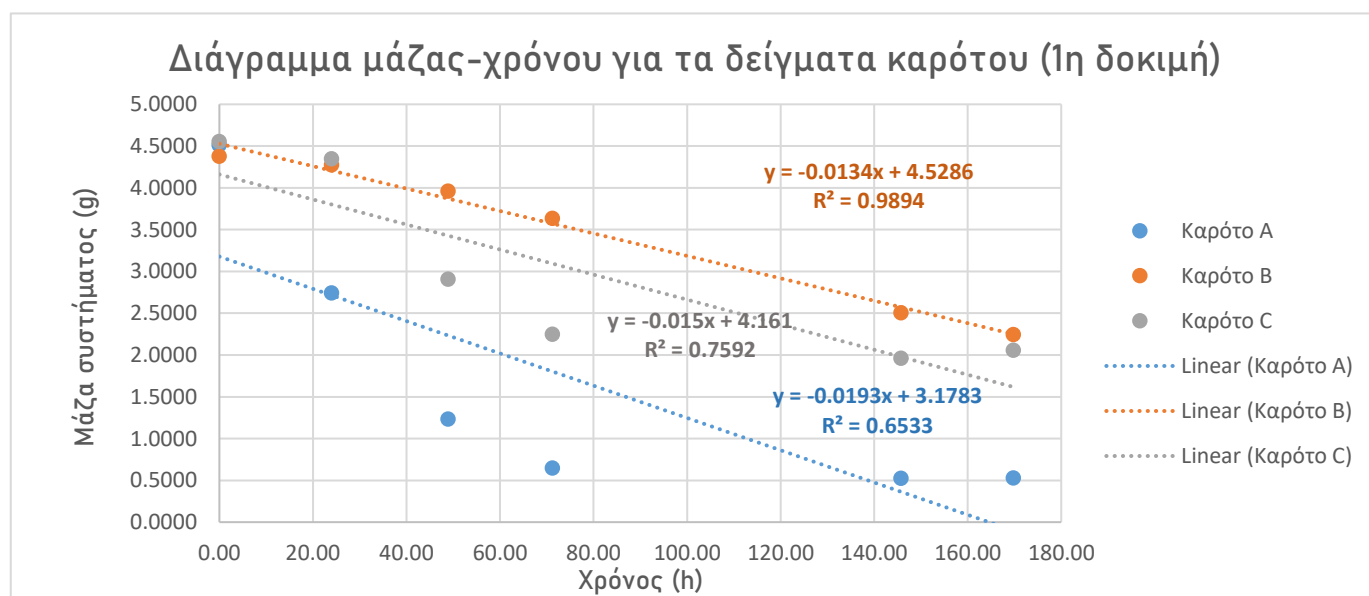
Μία από τις κύριες χρήσεις των πρωτεϊνικών φιλμ είναι η επικάλυψη τροφίμων με στόχο την υψηλή προστιθέμενη αξία σε αυτά και την προστασία τους από την αλλοίωση τους. Στόχος είναι η αύξηση της διατηρησιμότητας των τροφίμων και η αντικατάσταση ρυπογόνων συμβατικών επικαλύψεων και συσκευασιών με τα βιοσυμβατά φιλμ. Από τα πιο συνηθισμένα τρόφιμα είναι τα φρούτα και τα τυροκομικά επομένως σε αυτά έγιναν και οι δοκιμές εφαρμογής των παρασκευασμένων φιλμ ως μεμβράνες επικάλυψης.

Στα δείγματα της πρώτης δοκιμής επικάλυψης των τροφίμων, λήφθηκαν μετρήσεις μάζας τους με τις αντίστοιχες επικαλύψεις όπως φαίνεται στον Πίνακα 33.

Πίνακας 33: Μετρήσεις μάζας των δειγμάτων τροφίμων χωρίς επικάλυψη (A), με πλαστική μεμβράνη (B) και με φιλμ καζεΐνης με NADES Bet-Gly 1:2 (F2) (C) στη διάρκεια του χρόνου στους 25°C

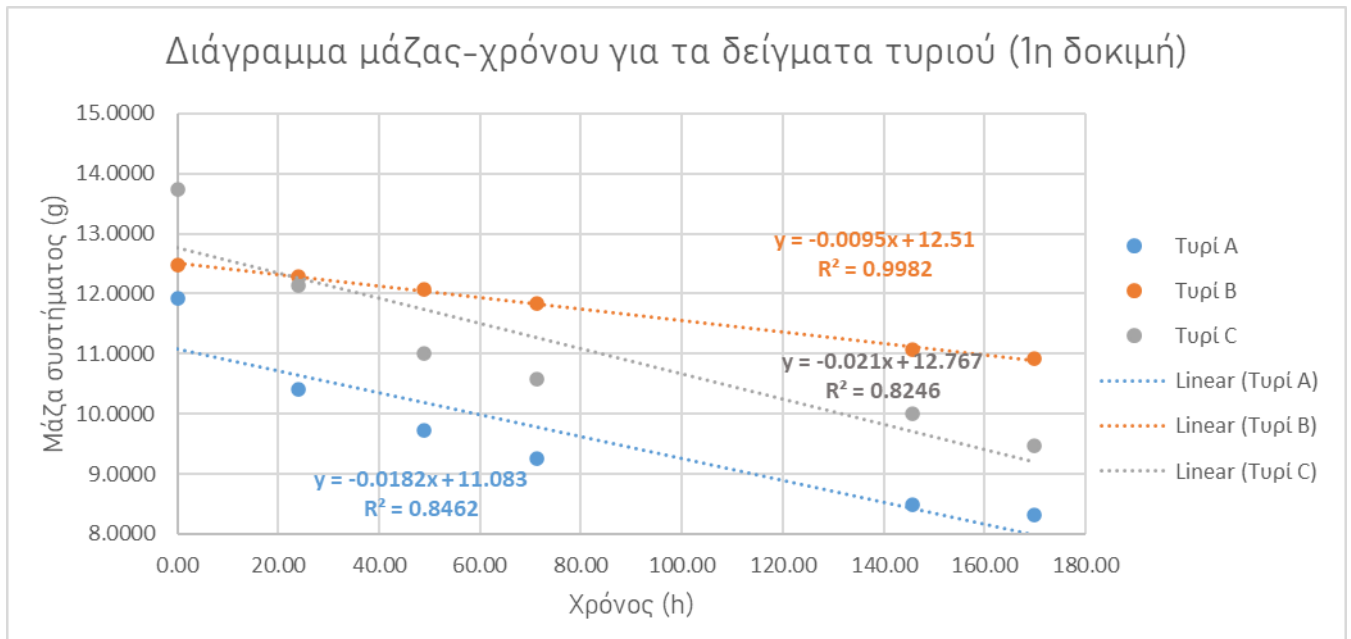
Χρόνος (h)	Καρότο			Τυρί		
	A	B	C	A	B	C
0.00	4.5118	4.3786	4.5534	11.9237	12.4840	13.7475
24.00	2.7433	4.2748	4.3490	10.4051	12.2955	12.1447
48.92	1.2340	3.9612	2.9064	9.7172	12.0677	11.0137
71.25	0.6488	3.6371	2.2506	9.2517	11.8379	10.5720
145.75	0.5242	2.5039	1.9631	8.4966	11.0796	10.0045
169.75	0.5295	2.2465	2.0569	8.3158	10.9174	9.4638

Για να υπολογιστεί ο ρυθμός απώλειας μάζας σχηματίστηκαν τα παρακάτω διαγράμματα μάζας-χρόνου για κάθε δείγμα προκειμένου να υπολογιστεί η κλίση της γραμμικής γραμμής τάσης.



Διάγραμμα 15: Διάγραμμα μάζας-χρόνου για τα δείγματα καρότου A (χωρίς μεμβράνη), B (με πλαστική μεμβράνη), C (με φιλμ καζεΐνης με NADES Bet-Gly 1:2 (F2)) κατά την πρώτη δοκιμή εφαρμογής

Από τις κλίσεις στο διάγραμμα μάζας-χρόνου (Διάγραμμα 15) για τα δείγματα καρότου, παρατηρείται ότι το μεγαλύτερο ρυθμό απώλειας μάζας (δηλαδή την μεγαλύτερη κλίση) την έχει το δείγμα A όπως αναμενόταν καθώς δεν έχει καμία επικάλυψη. Το δείγμα B έχει λίγο μικρότερο ρυθμό απώλειας σε σχέση με το δείγμα C γεγονός που δείχνει ότι όντως το φιλμ καζεΐνης όντως έδρασε προστατευτικά προς το καρότου. Όμως, δεν κατάφερε να ξεπεράσει τη δράση της πλαστικής μεμβράνης.



Διάγραμμα 16: Διάγραμμα μάζας-χρόνου για τα δείγματα τυριού A (χωρίς μεμβράνη), B (με πλαστική μεμβράνη), C (με φιλμ καζεΐνης με NADES Bet-Gly 1:2 (F2)) κατά την πρώτη δοκιμή εφαρμογής

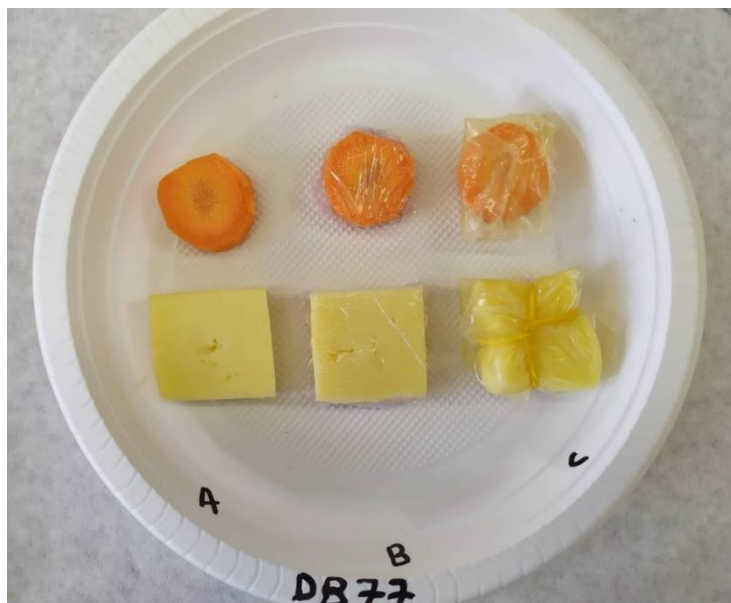
Από τις κλίσεις στο διάγραμμα μάζας-χρόνου (Διάγραμμα 16) για τα δείγματα τυριού, παρατηρείται ότι ο ρυθμός απώλειας μάζας των δειγμάτων A και C είναι σχεδόν ο ίδιος επομένως, το φιλμ καζεΐνης δεν έδρασε προστατευτικά προς το τυρί. Αντίθετα, η πλαστική μεμβράνη έδρασε προστατευτικά καθώς το δείγμα B έχει σχεδόν το μισό ρυθμό απώλειας των άλλων δειγμάτων.

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 34), υπολογίζεται η απώλεια μάζας των τροφίμων από την πρώτη μέτρηση μέχρι την τελική μέτρηση χωρίς μεμβράνη μετά το πέρας μιας εβδομάδας.

Πίνακας 34 : Μετρήσεις μάζας των δειγμάτων τροφίμων A, B, C χωρίς τις μεμβράνες και υπολογισμός απώλειας μάζας κατά την πρώτη δοκιμή εφαρμογής στους 25°C

	Καρότο			Τυρί		
	A	B	C	A	B	C
<b>Αρχικά</b>	4.5118	4.3786	4.5534	11.9237	12.3453	11.7399
<b>Τελικά</b>	0.5295	2.2465	2.0569	8.3158	10.6144	7.8752
<b>Απώλεια (%)</b>	<b>88.264</b>	<b>48.694</b>	<b>54.827</b>	<b>30.258</b>	<b>14.021</b>	<b>32.919</b>

Από τον παραπάνω πίνακα για τα δείγματα καρότου, φαίνεται ότι την μεγαλύτερη απώλεια βάρους είχε το δείγμα A χωρίς καμία επικάλυψη όπως ήταν αναμενόμενο. Συγκρίνοντας τα δείγματα B και C παρατηρείται μικρή διαφορά την απώλεια βάρους, με το δείγμα με φιλμ καζεΐνης να έχει μεγαλύτερη. Αναφορικά με τα δείγματα τυριού, φαίνεται ότι την μεγαλύτερη απώλεια βάρους είχε το δείγμα C (τυρί με φιλμ καζεΐνης) σε κοντινή τιμή με το δείγμα A (τυρί χωρίς επικάλυψη). Επομένως, το φιλμ καζεΐνης δεν προστάτευσε αρκετά το τυρί όπως η πλαστική μεμβράνη (δείγμα B).

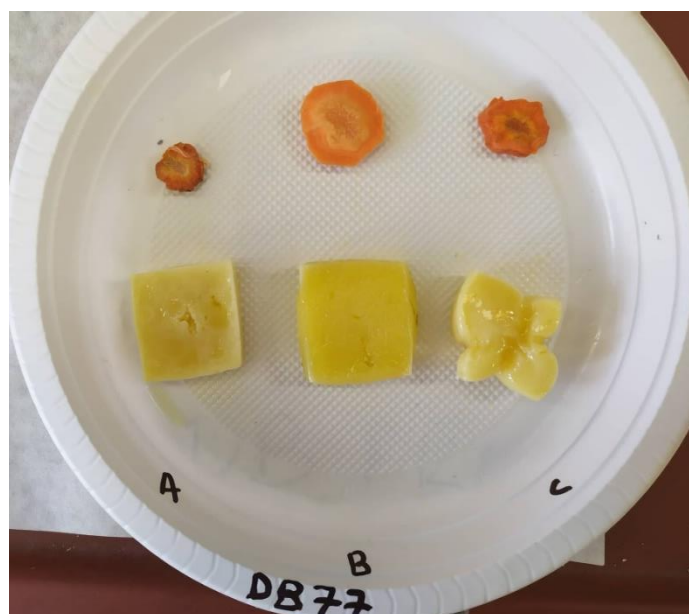


*Εικόνα 15: Πρώτη μέρα εφαρμογής*

*A: Δείγμα καρότου και τυριού χωρίς επικάλυψη.*

*B: Δείγμα καρότου και τυριού με επικάλυψη πλαστικής μεμβράνης.*

*C: Δείγμα καρότου και τυριού με φιλμ καζεΐνης με NADES Bet-Gly 1:2 (F2)*



*Εικόνα 16: Δείγματα τροφίμων μετά την αφαίρεση των μεμβρανών επικάλυψης και μετά το πέρας μιας εβδομάδας στην πρώτη δοκιμή*

*A: Δείγμα καρότου και τυριού χωρίς επικάλυψη.*

*B: Δείγμα καρότου και τυριού με επικάλυψη πλαστικής μεμβράνης.*

*C: Δείγμα καρότου και τυριού με επικάλυψη φιλμ καζεΐνης με NADES Bet-Gly 1:2 (F2).*

Μετά το πέρας μια εβδομάδας, τα δείγματα είχαν την όψη της Εικόνας 16.

Στο δείγμα καρότου Α παρατηρείται μεγάλη συρρίκνωση ενώ στο δείγμα C λίγο μικρότερη. Παράλληλα, στα δείγματα τυριού Α και C παρατηρείται μεγαλύτερη σκληρότητα συγκριτικά με το δείγμα Β κάτι που πιθανώς οφείλεται στην απομάκρυνση της υγρασίας.

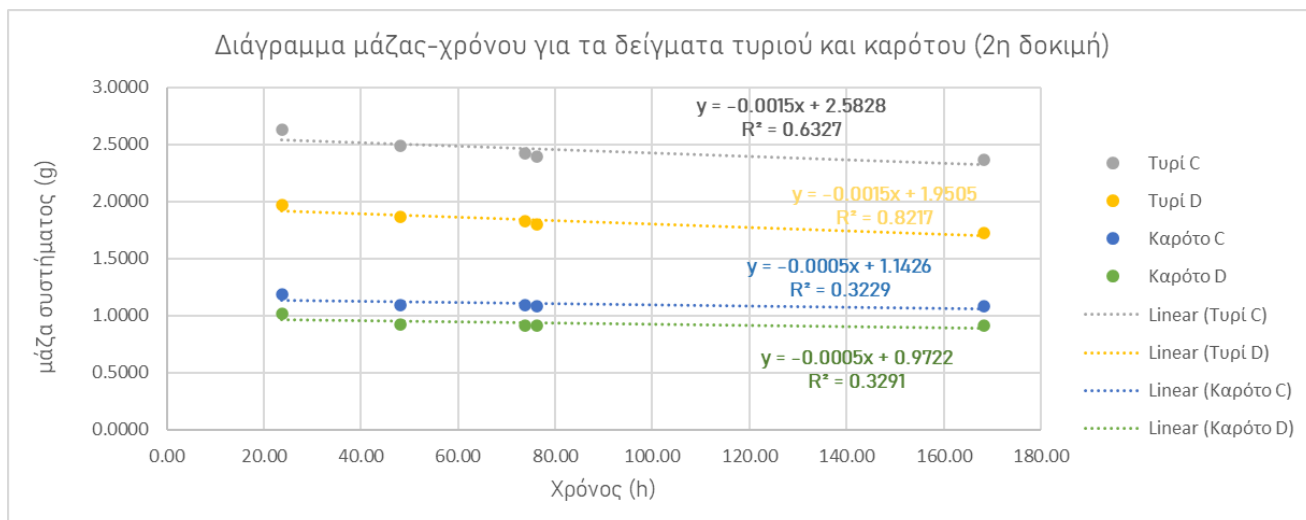
Κατά την δεύτερη δοκιμή επικάλυψης τροφίμου προστέθηκε και δείγμα των τροφίμων με επικάλυψη από φιλμ καζεΐνης με πλαστικοποιητή το εκχύλισμα χαμομηλιού που προέκυψε έπειτα από εκχύλιση με χρήση του διαλύτη Bet-Gly-W 1:2:1 προκειμένου να μελετηθεί η προστατευτική δράση του εκχυλίσματος χαμομηλιού σε σχέση με το σκέτο NADES Bet-Gly-W 1:2:1. Έτσι, μετρήθηκαν οι τιμές του παρακάτω πίνακα (Πίνακας 35) για τη μάζα των δειγμάτων τροφίμων με μεμβράνες.

Πίνακας 35 : Μετρήσεις μάζας των δειγμάτων τροφίμων χωρίς επικάλυψη (Α), με πλαστική μεμβράνη (Β), με φιλμ καζεΐνης με πλαστικοποιητή εκχύλισμα χαμομηλιού με NADES Bet-Gly-W 1:2:1 (F26). (C) και με φιλμ καζεΐνης με NADES Bet-Gly-W 1:2:1 (F6). (D) στη διάρκεια του χρόνου στους 30°C

Χρόνος (h)	Καρότο				Τυρί			
	A	B	C	D	A	B	C	D
0.00	1.4389	1.4190	2.0747	2.0181	2.2490	2.4949	3.2625	2.3868
23.67	0.3860	1.1817	1.1864	1.0150	1.7918	2.3966	2.6347	1.9675
48.00	0.2936	0.9043	1.0914	0.9217	1.6416	2.3024	2.4877	1.8643
73.83	0.2870	0.6119	1.0878	0.9175	1.5605	2.2020	2.4274	1.8246
76.17	0.2844	0.3823	1.0790	0.9097	1.5153	2.1094	2.3947	1.7976
168.17	0.2827	0.3162	1.0859	0.9155	1.4494	1.9028	2.3654	1.7289

Για να συγκριθεί ο ρυθμός απώλειας μάζας των δειγμάτων C και D , δηλαδή με και χωρίς εκχύλισμα, σχηματίστηκε το παρακάτω διάγραμμα μάζας-χρόνου για κάθε δείγμα προκειμένου να υπολογιστεί η κλίση της γραμμικής γραμμής τάσης.





Διάγραμμα 17: Διάγραμμα μάζας-χρόνου για τα δείγματα καρότου και τυριού C (φιλμ καζεΐνης με πλαστικοποιητή εκχύλισμα χαμομηλιού με NADES Bet-Gly-W 1:2:1 (F26)) και D (φιλμ καζεΐνης με NADES Bet-Gly-W 1:2:1 (F6)) κατά την δεύτερη δοκιμή εφαρμογής

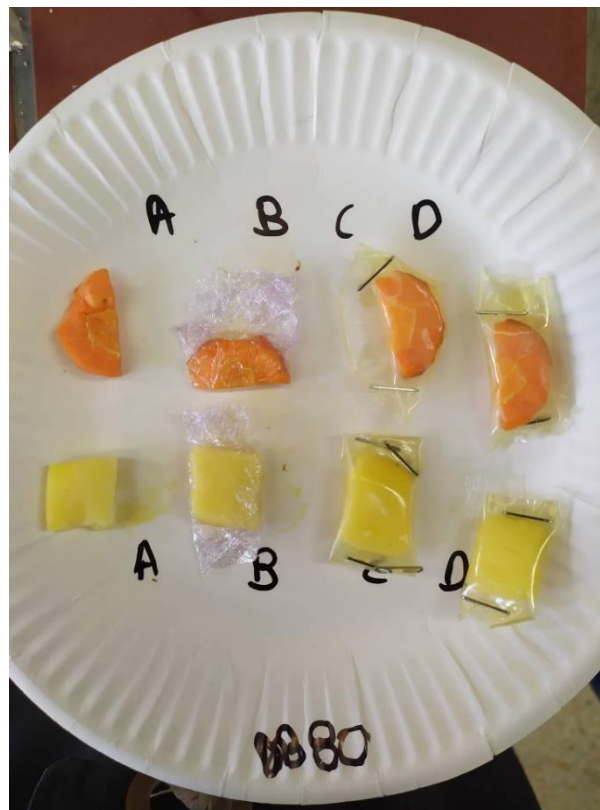
Από τις κλίσεις στο διάγραμμα μάζας-χρόνου (Διάγραμμα 17) για τα δείγματα καρότου και τυριού, παρατηρείται ότι ο ρυθμός απώλειας μάζας δεν μεταβάλεται σε σχέση με την παρουσία του εκχυλίσματος στο φιλμ. Η κλίση στα διαγράμματα C&D τυριού είναι ίδια όπως και στα διαγράμματα καρότου επομένως ο ρυθμός απώλειας μάζας δεν επηρεάζεται από το αν το φιλμ περιέχει εκχύλισμα χαμομηλιού.

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 36) υπολογίζεται η απώλεια μάζας των τροφίμων από την πρώτη μέτρηση μέχρι την τελική μέτρηση χωρίς μεμβράνη μετά το πέρας μιας εβδομάδας.

Πίνακας 36 : Μετρήσεις μάζας των δειγμάτων τροφίμων A, B, C, D χωρίς τις μεμβράνες και υπολογισμός απώλειας μάζας κατά τη δεύτερη δοκιμή εφαρμογής στους 30°C

	Καρότο				Τυρί			
	A	B	C	D	A	B	C	D
<b>Αρχικά</b>	1.5190	1.3391	1.2560	1.3753	2.3065	2.4308	2.3618	1.7048
<b>Τελικά</b>	0.2827	0.2205	0.2709	0.2676	1.4494	1.7644	1.4492	1.0174
<b>Απώλεια (%)</b>	<b>81.3891</b>	<b>83.5337</b>	<b>78.4315</b>	<b>80.5424</b>	<b>37.1602</b>	<b>27.4148</b>	<b>38.6400</b>	<b>40.3214</b>

Από τον παραπάνω πίνακα για τα δείγματα καρότου, φαίνεται ότι δεν υπήρξαν μεγάλες διαφορές στην απώλεια μάζας σε σχέση με την επικάλυψη του δείγματος. Αναφορικά με τα δείγματα τυριού, φαίνεται ότι την μεγαλύτερη απώλεια βάρους είχε το δείγμα D (τυρί με φιλμ καζεΐνης) σε κοντινή τιμή με το δείγμα C (τυρί με φιλμ με εκχύλισμα). Επομένως, τα φιλμ καζεΐνης δεν έδρασαν αντίστοιχα ικανοποιητικά όπως η πλαστική μεμβράνη (δείγμα B). Τα τρόφιμα με επικάλυψη φιλμ καζεΐνης με πλαστικοποιητή εκχύλισμα χαμομηλιού με NADES Bet-Gly-W 1:2:1 (F26) (C) είχαν μικρότερη απώλεια μάζας από τα αντίστοιχα με φιλμ καζεΐνης με NADES Bet-Gly-W 1:2:1 (F6). Αυτό έρχεται σε συμφωνία με την μειωμένα WVP του φιλμ με NADES-εκχύλισμα (F26) σε σχέση με το φιλμ με χρήση σκέτο NADES (F6). Άρα, το εκχύλισμα έδρασε προστατευτικά προς το τρόφιμο και την αποφυγή αλλοίωσης του.



*Εικόνα 17: Πρώτη μέρα εφαρμογής*

*A: Δείγμα καρότου και τυριού χωρίς επικάλυψη.*

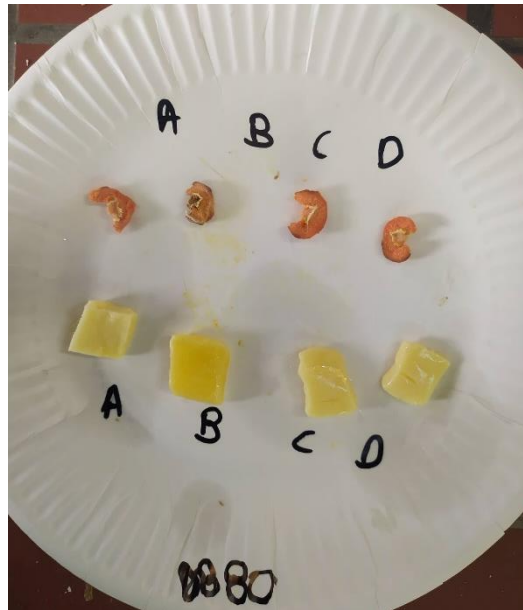
*B: Δείγμα καρότου και τυριού με επικάλυψη πλαστικής μεμβράνης.*

*C: Δείγμα καρότου και τυριού με φιλμ καζεΐνης με πλαστικοποιητή εκχύλισμα χαμομηλιού με NADES Bet-Gly-W 1:2:1 (F26).*

*D: Δείγμα καρότου και τυριού με φιλμ καζεΐνης με NADES Bet-Gly-W 1:2:1 (F6).*

Παρατηρείται ότι τα αποτελέσματα της δεύτερης δοκιμής δίνουν βελτιωμένη προστασία στα φιλμ σε σχέση με την πρώτη και αυτό μπορεί να οφείλεται στην έλλειψη αεροστεγούς σφραγίσματος στα δείγματα της πρώτης δοκιμής. Η μεγαλύτερη απώλεια μάζας σε όλα τα δείγματα της δεύτερης δοκιμής σε σχέση με την πρώτη μπορεί να οφείλεται στην αυξημένη θερμοκρασία διεξαγωγής της δεύτερης δοκιμής- περίπου 5°C περισσότερο.

Μετά το πέρας μια εβδομάδας, τα δείγματα είχαν την όψη της Εικόνας 18.



*Εικόνα 18: Δείγματα τροφίμων μετά την αφαίρεση των μεμβρανών επικάλυψης και μετά το πέρας μιας εβδομάδας στην πρώτη δοκιμή*  
*A: Δείγμα καρότου και τυριού χωρίς επικάλυψη.*  
*B: Δείγμα καρότου και τυριού με επικάλυψη πλαστικής μεμβράνης.*  
*C: Δείγμα καρότου και τυριού με φιλμ καζεΐνης με πλαστικοποιητή εκχύλισμα χαμομηλιού με NADES Bet-Gly-W 1:2:1 (F26).*  
*D: Δείγμα καρότου και τυριού με φιλμ καζεΐνης με NADES Bet-Gly-W 1:2:1 (F6).*

Σε όλα τα δείγματα παρατηρείται παρόμοια συρρίκνωση το οποίο επιβεβαιώνεται και από τις κοντινές τιμές απώλειες μάζας του προηγούμενου πίνακα. Παρόλα αυτά, το τυρί B φαίνεται να είναι λιγότερο σκληρό σε σχέση με τα τυριά C&D.

## 4. Συμπεράσματα

Στο πλαίσιο μιας ευρύτερης προσπάθειας για αντικατάσταση των πλαστικών πετροχημικής προέλευσης, στην παρούσα εργασία στόχος είναι η παρασκευή βιοσυμβατών βιοπολυμέρων προερχόμενων από πρωτεΐνες που υπάρχουν σε μεγάλες ποσότητες στο γάλα αλλά και στα παραπροϊόντα του. Η καινοτομία βρίσκεται στον τρόπο παρασκευής των πρωτεϊνικών φιλμ καθώς για πρώτη φορά σύμφωνα με τη βιβλιογραφική ανασκόπηση που πραγματοποιήθηκε, σχηματίζονται πρωτεϊνικά φιλμ που προέρχονται από πρωτεΐνες γάλακτος χρησιμοποιώντας NADES ως πλαστικοποιητές. Άλλη μια καινοτομία αποτελεί το γεγονός πως οι NADES σχεδιάστηκαν στοχευμένα και οικονομικά από ασφαλή υλικά με επιθυμητές ιδιότητες για τη συγκεκριμένη εφαρμογή αλλά επίσης πραγματοποιήθηκε και μελέτη της επίδρασής τους στις μηχανικές ιδιότητες των φιλμ. Αυτά τα πρωτεϊνικά φιλμ βρίσκουν κύρια εφαρμογή στην επικάλυψη τροφίμων γι' αυτό και η χρήση τους ως επικάλυψη τροφίμων μπορεί όχι μόνο να αντικαταστήσει συμβατικές εμπορικές μεμβράνες ως προς την επέκταση της διάρκειας ζωής των τροφίμων και την προστασία τους από εξωγενείς αλλοιωτικούς παράγοντες αλλά και να προσδώσει υψηλή πρωτεϊνική αξία σε αυτά. Για την μελέτη των παραπάνω, η παρούσα εργασία χωρίστηκε στα παρακάτω διακριτά μέρη:

1. Σύνθεση και χαρακτηρισμός των φυσικών βαθέως ευτηκτικών διαλυτών με μέτρηση pH, πολικότητας και με λήψη φασμάτων υπερύθρου (FTIR-ATR).
2. Σχηματισμός βιοσυμβατών πρωτεϊνικών φιλμ με πρώτη ύλη τις κύριες πρωτεΐνες του γάλακτος δηλαδή την καζεΐνη και τις πρωτεΐνες ορού γάλακτος και με χρήση των συντεθειμένων NADES ως πλαστικοποιητές και τροποποιητές των ιδιοτήτων των φιλμ
3. Χαρακτηρισμός των καλύτερα σχηματισμένων πρωτεϊνικών φιλμ με μέτρηση μάζας, πάχους, διαπερατότητας υδρατμών (WVP), διαλυτότητας σε νερό (WS), μηχανικές ιδιότητες όπως προέκυψαν από μετρήσεις ανάλυσης υφής (Burst Strength, Distance at Burst, ελαστικότητα, συνεκτικότητα, ανθεκτικότητα, προσκολλησιμότητα) και με φασματοσκοπία FTIR (ATR).
4. Διερεύνηση εφαρμογής των φιλμ ως μεμβράνες επικάλυψης τροφίμων: καρότου και τυριού

Τα συμπεράσματα που εξάγονται αφορούν από την παρούσα διπλωματική εργασία συνοψίζονται στη συνέχεια και αφορούν τόσο κάθε βήμα της μελέτης που πραγματοποιήθηκε όσο και την αλληλεπίδραση των βημάτων αυτών.

### ❖ Χαρακτηρισμός NADES, διάλυση καζεΐνης και συσχέτιση με τα πρωτεϊνικά φιλμ

Μετά την μέτρηση pH των NADES και τον σχηματισμό των πρωτεϊνικών φιλμ από αυτά, συμπεραίνεται ότι οι διαλύτες με βασικό pH, δηλαδή οι NADES Bet-Gly 1:2 (pH=8.41) και Bet-Gly-W 1:2:1 (pH=9.03), και με σχεδόν ουδέτερο pH, δηλαδή οι NADES Pro-Gly 1:2 (pH=7.25) και Sodium Acetate-Gly 1:9 (pH=7.63 σε 5%w/w αραιώση σε απιονισμένο νερό), σχηματίζουν φιλμ ως πλαστικοποιητές στην κατάλληλη αναλογία ενώ οι πλαστικοποιητές με όξινο pH, δηλαδή οι ChCl-Gly 1:2 (pH=6.65) και ChCl-Gly-W 1:2:1 (pH=6.15) δεν προσφέρουν ικανοποιητική πλαστικοποίηση στα φιλμ.

Σύμφωνα με τη μέτρηση πολικότητας με τη μέθοδο Nile Red των διαλυτών, ο πιο πολικός NADES από όσους παρασκευάστηκαν είναι ο Sodium Acetate-Gly 1:9. Παρατηρείται ότι ο συγκεκριμένος NADES δεν κατάφερε να δράσει αποτελεσματικά ως πλαστικοποιητής στα φιλμ WPI ενώ οδήγησε στη δημιουργία θολών φιλμ καζεΐνης σε σχέση με τα διάφανα φιλμ που παρασκευάστηκαν με τη χρήση των υπόλοιπων NADES. Επομένως, η πολικότητα του διαλύτη θα μπορούσε να συνδεθεί αρνητικά με την πλαστικοποίηση που προσφέρει στο πρωτεϊνικό φιλμ.

Μετά τις δοκιμές διάλυσης καζεΐνης σε νερό, NADES ή συστήματα NADES/νερού με θέρμανση ή/και υπέρηχους που δεν επηρέασαν την διαλυτότητα της, παρατηρήθηκε ότι ο μόνος συνδυασμός επιτυχημένης διάλυσης της είναι η προσθήκη NaOH στο πρωτεϊνικό διάλυμα και η θέρμανση του. Έτσι, κατά την παρασκευή των φιλμ, η προσθήκη μερικών σταγόνων NaOH 1M, για την ρύθμιση του pH, και η θέρμανση του διαλύματος ήταν απαραίτητα βήματα προκειμένου να διαλυθεί πλήρως η καζεΐνη. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για τη διάλυση των πρωτεϊνών ορού γάλακτος προκειμένου το πρωτεϊνικό διάλυμα να είναι ομογενές πριν την χύτευση του.

#### ❖ Σχηματισμός βιοσυμβατών πρωτεϊνικών φιλμ

Τα φιλμ καζεΐνης που σχηματίστηκαν με μεγαλύτερη επαναληψιμότητα περιείχαν τα NADES Bet-Gly 1:2, Bet-Gly 1:2:1, Pro-Gly 1:2 και Sodium Acetate-Gly 1:9 σε αναλογία καζεΐνης:DES 1:1 και το NADES Pro-Gly 1:2 σε αναλογία καζεΐνης:DES 1:2. Η βέλτιστη περιεκτικότητα σε NADES βρέθηκε μετά από διαφορετικές δοκιμές και αποδεικνύοντας ότι λειτουργεί πλαστικοποιητικά αφού σε μικρές αναλογίες δημιουργούσε εύθραυστα φιλμ και σε μεγάλες, πολύ κολλώδη, χωρίς σαφή όρια φιλμ.

Πραγματοποιήθηκε επίσης ο σχηματισμός φιλμ καζεΐνης με χρήση των συστατικών των NADES σε μορφή φυσικού μίγματος. Όλα τα φιλμ σχηματίστηκαν εκτός από το φιλμ με φυσικό μίγμα Sodium Acetate-Gly 1:9 και γι'αυτό μπορεί να ευθύνεται η υψηλή του πολικότητα. Ο σχηματισμός των φιλμ με φυσικό μίγμα μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι κατά την προσθήκη του φυσικού μίγματος, το πρωτεϊνικό διάλυμα είναι θερμό και έπειτα θερμαίνεται ξανά στους 60°C (θερμοκρασία που πραγματοποιείται η σύνθεση των NADES). Επομένως, μια πιθανή εξήγηση είναι ότι ο βαθέως ευτηκτικός διαλύτης σχηματίζεται εντός του διαλύματος και εν τέλει βοηθά στο σχηματισμό φιλμ. Ωστόσο, τα φιλμ με χρήση των φυσικών μιγμάτων είχαν μεγάλες διαφορές στις ιδιότητες σε σχέση με τα φιλμ με χρήση των NADES των αντίστοιχων μιγμάτων.

Τα βέλτιστα φιλμ WPI που σχηματίστηκαν με μεγαλύτερη επαναληψιμότητα περιείχαν τα NADES Bet-Gly 1:2, Bet-Gly 1:2:1 και Pro-Gly 1:2 σε αναλογία καζεΐνης:DES 1:1. Ομοίως με τα φιλμ καζεΐνης, η βέλτιστη περιεκτικότητα σε NADES βρέθηκε μετά από διαφορετικές δοκιμές και αποδεικνύοντας ότι λειτουργεί πλαστικοποιητικά αφού σε μικρές αναλογίες δημιουργούσε εύθραυστα φιλμ και σε μεγάλες δημιουργούσε πολύ κολλώδη, χωρίς σαφή όρια φιλμ.

Συγκρίνοντας τα φιλμ WPI και καζεΐνης με NADES σε σχέση με τα αντίστοιχα φιλμ στα οποία χρησιμοποιήθηκε η γλυκερόλη ως συμβατικός πλαστικοποιητής παρατηρείται ότι η κατάλληλη περιεκτικότητα των NADES (αναλογία πρωτεΐνης/NADES 1:1) μπορεί να αποδίδει καλύτερη πλαστικοποίηση στα φιλμ σε σχέση με την ίδια αναλογία γλυκερόλης. Επιπλέον, τα πρωτεϊνικά φιλμ διέφεραν ως προς το χρώμα αφού τα φιλμ καζεΐνης ήταν διάφανα και διαυγή ενώ τα φιλμ WPI καφέ, πιθανότατα λόγω της μετουσίωσης των πρωτεϊνών ορού γάλακτος.

❖ Χαρακτηρισμός των καλύτερα σχηματισμένων πρωτεϊνικών φιλμ και εφαρμογή επικάλυψης τροφίμου

Το πάχος των φιλμ ήταν σε εύρος 0.24–0.36 mm και η μάζα των φιλμ ήταν σε εύρος 0.75–0.82g για όλα τα φιλμ με διάμετρο 5.6cm με εξαίρεση το φιλμ καζεΐνης με Pro-Gly 1:2 με αναλογία καζεΐνης-πλαστικοποιητή 1:2 που εμφανίζει μεγαλύτερο πάχος και μάζα σε σχέση με όλα τα υπόλοιπα φιλμ. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην διπλάσια περιεκτικότητα του σε NADES. Επιπλέον, τα φιλμ WPI έχουν μεγαλύτερη διαπερατότητα υδρατμών από τα φιλμ καζεΐνης με ίδιο πλαστικοποιητή. Την μικρότερη διαπερατότητα υδρατμών έχουν τα φιλμ καζεΐνης με πλαστικοποιητή το NADES Pro-Gly 1:2 ενώ το φιλμ με χρήση NADES-εκχύλισμα χαμομηλιού μειώνει την WVP. Τα φιλμ με χρήση φυσικών μιγμάτων έχουν κατά κύριο λόγο μικρότερη WVP σε σχέση με τα φιλμ με χρήση των αντίστοιχων NADES των μιγμάτων. Παρόλα αυτά το WVP των φιλμ είναι εντός βιβλιογραφικών ορίων σε χαμηλές τιμές, δηλαδή από 2.6 έως  $7.7 \cdot 10^{-10} \text{ g / (m s Pa)}$ , και οι NADES βοηθάνε στη μείωση της διαπερατότητας. Ακόμα, τα φιλμ καζεΐνης είναι πλήρως υδατοδιαλυτά σε αντίθεση με τα φιλμ WPI που έχουν υδατοδιαλυτότητα 50.6% επομένως είναι καταλληλότερα για χρήση στην επικάλυψη τροφίμων καθώς τα τρόφιμα έχουν υψηλά ποσοστά υγρασίας.

Κατά τη δοκιμή θραύσης της ανάλυσης υφής αποδείχτηκε ότι για τους ίδιους διαλύτες, τα φιλμ καζεΐνης με πλαστικοποιητή NADES είναι πιο σκληρά και εύθραυστα σε σχέση με τα φιλμ καζεΐνης με πλαστικοποιητή τα φυσικά μίγματα των αντίστοιχων NADES και με τα φιλμ WPI. Τα φιλμ καζεΐνης με χρήση NADES είχαν δύναμη θραύσης (Burst Strength) έως και 1617.9 N ενώ τα φιλμ με WPI έως 551.8 N.

Στη συνέχεια, κατά τη δοκιμή συμπίεσης της ανάλυσης υφής αποδείχτηκε ότι τα περισσότερα συνεκτικά και ελαστικά φιλμ περιείχαν καζεΐνη και NADES με συστατικό την βεταΐνη ενώ τα περισσότερα ανθεκτικά και προσκολλησίμα φιλμ ήταν φιλμ καζεΐνης με NADES Pro-Gly 1:2 σε αναλογία καζεΐνης-NADES 1:2. Τα φιλμ καζεΐνης με φυσικό μίγμα σε σχέση με τα αντίστοιχα που περιέχουν NADES έχουν όμοια ή αυξημένη ανθεκτικότητα και ελαστικότητα και μεγαλύτερη προσκολλησιμότητα. Το φιλμ που περιέχει εκχύλισμα χαμομηλιού πλεονεκτεί στην ανθεκτικότητα και στην προσκολλησιμότητα από το αντίστοιχο φιλμ με NADES.

Τα φάσματα FTIR για τα βιοσυμβατά πρωτεϊνικά φιλμ δεν παρουσίασαν μεγάλες διαφορές ούτε σχετικά με το είδος της πρωτεΐνης αλλά ούτε και με το είδος του πλαστικοποιητή. Επομένως, οι πρωτεΐνες του γάλακτος με παρόμοια απεικόνιση στο υπέρυθρο φάνηκε να καθόρισαν και την αντίστοιχη απεικόνιση των φιλμ. Τα φιλμ καζεΐνης με πλαστικοποιητή τα φυσικά μίγματα των NADES δεν έδωσαν φάσματα με σημαντικές διαφορές από τα αντίστοιχα των φιλμ με πλαστικοποιητή τα σκέτα NADES κι αυτό μπορεί να ερμηνευτεί από το γεγονός ότι ο βαθύς ευτηκτικός διαλύτης σχηματίζεται εντός του διαλύματος.

Από την μελέτη δοκιμής επικάλυψης τροφίμου με τα φιλμ καζεΐνης παρατηρήθηκε ότι έδρασαν περισσότερο προστατευτικά στο καρότο από ότι στο τυρί και ότι η απώλεια μάζας ήταν μικρότερη στα τρόφιμα επικαλυμμένα με φιλμ καζεΐνης από ότι στα τρόφιμα που δεν είχαν κάποια επικάλυψη. Όμως, η προστατευτική δράση των φιλμ απέχει από αυτή της πλαστικής εμπορικής μεμβράνης. Τέλος, το φιλμ με εκχύλισμα χαμομηλιού μείωσε την απώλεια υγρασίας από το τρόφιμο σε σχέση με το αντίστοιχο φιλμ καζεΐνης με NADES.

## 5. Προτάσεις για το μέλλον

Στην παρούσα διπλωματική εργασία αναπτύχθηκαν προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας από καζεΐνη και πρωτεΐνη ορού γάλακτος με χρήση βιοσυμβατών πράσινων διαλυτών. Έτσι, πραγματοποιήθηκε έρευνα σχετικά με τη χρήση των φυσικών βαθέως ευτηκτικών διαλυτών ως πλαστικοποιητές και τροποποιητές των ιδιοτήτων βιοσυμβατών πρωτεϊνικών φιλμ. Παρόλο που τα πρωτεϊνικά βιοπολυμερή είναι αρκετά διαδεδομένα και ανερχόμενα τα τελευταία χρόνια, αποτελεί καινοτομία η προσθήκη σε αυτά πράσινων πλαστικοποιητών έναντι των συμβατικών και ο τρόπος παραγωγής τους εφαρμόζει τις αρχές της κυκλικής οικονομίας λόγω της αξιοποίησης αποβλήτων. Γι' αυτό το λόγο, υπάρχει χώρος για περαιτέρω βελτιώσεις και νέα βήματα που αξίζει να πραγματοποιηθούν στην έρευνα αυτή.

Αρχικά, υπάρχει χώρος βελτίωσης στον τρόπο διάλυσης των πρωτεϊνών στο διάλυμα που πρόκειται να δημιουργήσει το φιλμ. Παρατηρήθηκε ότι η αύξηση του pH προκαλεί διάλυση της πρωτεΐνης επομένως, αντί του NaOH μπορεί να χρησιμοποιηθεί κάποια άλλη βάση που να συνδυάσει την αύξηση του pH του διαλύματος με την βελτίωση των ιδιοτήτων του φιλμ. Για παράδειγμα, το υδροξείδιο του ασβεστίου  $\text{Ca(OH)}_2$  μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ως φυσική ενίσχυση ασβεστίου σε τρόφιμα αλλά και να αυξήσει το pH του πρωτεϊνικού διαλύματος. Επιπλέον, μπορούν να δοκιμαστούν περισσότερο βασικοί πλαστικοποιητές (NADES) προκειμένου να απαιτείται μικρότερη ποσότητα πρόσθετης ένωσης για την αύξηση του pH.

Παράλληλα, προτείνεται ο περαιτέρω σχεδιασμός πρωτεϊνικών φιλμ σε διαφορετικές περιεκτικότητες πρωτεΐνης στο υδατικό διάλυμα όπως 10%,15% κλπ προκειμένου να αυξηθεί η προστιθέμενη αξία του φιλμ αλλά και να μελετηθούν οι διαφορές στις ιδιότητες των φιλμ σε σχέση με την περιεκτικότητα τους σε πρωτεΐνες γάλακτος. Ακόμα, μπορούν να χρησιμοποιηθούν διαφορετικοί τρόποι ξήρανσης όπως θερμική συμπίεση για την μείωση της χρονικής διάρκειας της πειραματικής διαδικασίας και της συντόμευσης της παρασκευής των φιλμ. Αυτή η βελτιστοποίηση θα βοηθήσει και στην ανακλιμάκωση της διαδικασίας σε πιλοτική και αργότερα βιομηχανική κλίμακα.

Στη συνέχεια, για επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων απαιτούνται περισσότερες επαναλήψεις στα φιλμ καζεΐνης με εκχύλισμα χαμομηλιού και με φυσικά μίγματα ως πλαστικοποιητές. Επιπλέον, ενδιαφέρον θα είχε η δοκιμή σχηματισμού φιλμ WPI με φυσικά μίγματα των αντίστοιχων DES που χρησιμοποιήθηκαν και εκχυλίσματα για τη σύγκριση των ιδιοτήτων τους τόσο ανάμεσα στα διαφορετικά είδη φιλμ WPI όσο και στα αντίστοιχα σχηματισμένα φιλμ καζεΐνης. Επιπλέον, επειδή παρατηρήθηκε ότι ήταν πιο εύκολος ο σχηματισμός των φιλμ WPI όσο πιο αυξημένο ήταν το pH, μπορεί να γίνει επανάληψη παρασκευής των φιλμ στοχευμένα για διαφορετικά pH του διαλύματος με τον ίδιο NADES προκειμένου να επιβεβαιωθεί αυτή η παρατήρηση.

Σχετικά με το χρώμα των φιλμ, θα ήταν βοηθητική η μέτρηση του με ειδικό χρωματόμετρο ώστε να συσχετιστεί η αλλαγή του χρώματος του φιλμ με το είδος της πρωτεΐνης και του πλαστικοποιητή που χρησιμοποιήθηκε. Αξίζει να διερευνηθεί μια μέθοδος αποχρωματισμού των φιλμ WPI που έχουν έντονο καφέ χρώμα καθώς απευθύνονται σε καταναλωτικό κοινό και οι διάφανες άχρωμες επικαλύψεις τροφίμων προτιμώνται. Ακόμα, έχει νόημα η μέτρηση αδιαφάνειας (opacity) των φιλμ και η έρευνα ως προς την βελτιστοποίηση της. Μια ακόμη ιδιότητα που θα ήταν χρήσιμη για φιλμ που αφορούν στην επικάλυψη και συσκευασία τροφίμων είναι η διαπέραση τους σε οξυγόνο καθώς αποτελεί σημαντικό παράγοντα αλλοίωσης των τροφίμων.

Παράλληλα, ως προς τον χαρακτηρισμό των NADES και των φιλμ είναι απαιτείται μια θερμική μέθοδος ανάλυσης όπως Θερμοσταθμική Ανάλυση (TGA) ή Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης (DSC). Έτσι, θα μπορούσε να ληφθεί καμπύλη θερμικής διάσπασης των διαλυτών και των φιλμ και να συγκριθεί η θερμική σταθερότητα τους. Συμπληρωματικά, για τον δομικό χαρακτηρισμό των διαλυτών και των φιλμ μπορεί να χρησιμοποιηθεί φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR) και για να ληφθούν περαιτέρω πληροφορίες σχετικά με τη μορφολογία των παρασκευασμένων μεμβρανών μπορούν να ληφθούν εικόνες SEM (Scanning Electron Microscope – Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης).

Είναι απαραίτητο βήμα οι περισσότερες επαναλήψεις στις επικαλύψεις τροφίμων με τα πρωτεϊνικά φιλμ και η χρήση των φιλμ WPI στις δοκιμές αυτές. Για πιο αξιόπιστα πειραματικά αποτελέσματα, θα πρέπει να υπάρχουν σταθερές περιβαλλοντικές συνθήκες και να βελτιωθεί ο τρόπος επικάλυψης των τροφίμων έτσι ώστε να μην εισέρχεται αέρας στο τρόφιμο. Μπορεί να γίνει περαιτέρω μελέτη δοκιμής επικάλυψης με άλλους τρόπους όπως εμφύσηση του τροφίμου στο διάλυμα προς σχηματισμό φιλμ πάνω στο τρόφιμο ή ψεκασμό του υλικού στο τρόφιμο. Επιπλέον, για τον έλεγχο της προστασίας των φιλμ προς το τρόφιμο θα είναι χρήσιμος ο μικροβιολογικός έλεγχος στο τρόφιμο μετά την επικάλυψη του. Ακόμα, χρειάζεται μελέτη της βιοδραστικότητας των πρωτεϊνικών φιλμ.

Τέλος, το βασικό βήμα που θα επεκτείνει τη μελέτη αυτή είναι η αξιοποίηση απευθείας του ορού γάλακτος για την παραγωγή των βιοσυμβατών μεμβρανών. Αυτό μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε ακολουθώντας τις διεργασίες που προτείνονται βιβλιογραφικά (παράγραφος 1.1.4) και στην εργαστηριακή μελέτη με στόχο την απομόνωση WPI και την χρήση της για σχηματισμό φιλμ όπως περιγράφηκε είτε με λυοφιλοποίηση (freeze-drying) του υγρού ορού γάλακτος και δοκιμή παρασκευής βιοσυμβατής μεμβράνης με την αφυδατωμένη-σκόνη ορού (whey powder) προκειμένου να μειωθούν περισσότερο τα στάδια της διεργασίας. Η βιομηχανική εφαρμογή της εργαστηριακής αυτής μελέτης είναι εφικτή καθώς όλα τα στάδια μπορούν να μηχανοποιηθούν και να αυτοματοποιηθούν μετά την κατάλληλη επιλογή για το βέλτιστο σχεδιασμό φιλμ απο πρωτεΐνες ορού γάλακτος με NADES ως πλαστικοποιητές.

Η συγκεκριμένη μελέτη προσφέρει πολλά οφέλη σχετικά τη βιωσιμότητα και η χρήση πρωτεϊνικών μεμβρανών στη συσκευασία τροφίμων εφαρμόζει τις αρχές της κυκλικής οικονομίας καθώς τα βιοπολυμερή εκτός από αποικοδομήσιμα, αποτελούνται από πρώτες ύλες ανανεώσιμων πηγών. Έτσι, υπάρχει μικρό περιβαλλοντικό αποτύπωμα και τα βιοπολυμερή προέρχονται από τη φύση και επιστρέφουν σε αυτήν. Τελικά υιοθετείται μια πράσινη διεργασία αφού χρησιμοποιούνται φιλικόι προς το περιβάλλον, βιοσυμβατοί και βιοδραστικοί διαλύτες (NADES), προερχόμενοι από οικονομικά υλικά.



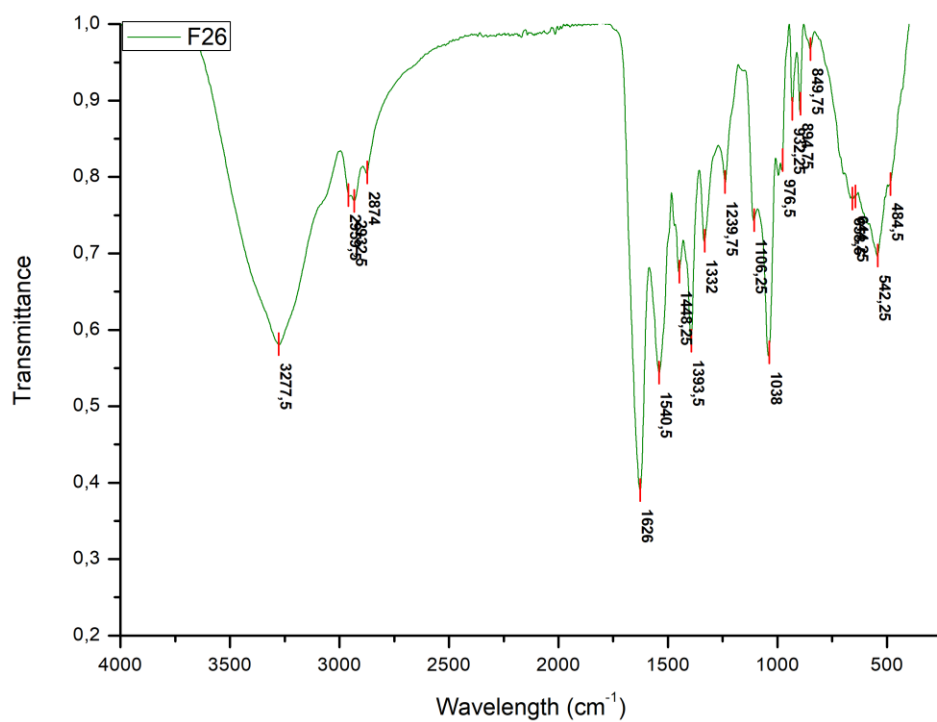
## Βιβλιογραφία

1. Gupta, C. and Prakash, D., 2017. Therapeutic Potential of Milk Whey. *Beverages*, 3(3), p.31.
2. Robinson, R., 1994. Modern dairy technology. London: Chapman & Hall, pp.313-316.
3. Belitz, H., Grosch, W. and Schieberle, P., 2009. Food chemistry. Berlin: Springer, pp.501-538.
4. Bansal, N., Bhandari, B. (2016). Functional Milk Proteins: Production and Utilization—Whey-Based Ingredients. In: McSweeney, P., O'Mahony, J. (eds) *Advanced Dairy Chemistry*. Springer, New York, NY, pp. 67-98.
5. Mulvihill, D. M., & Ennis, M. P. (2003). Functional Milk Proteins: Production and Utilization. *Advanced Dairy Chemistry—1 Proteins*, 1175-1228.
6. El-Tanboly, E., 2017. Recovery of Cheese Whey, a by-Product from the Dairy Industry for use as an Animal Feed. *Journal of Nutritional Health & Food Engineering*, 6(5).
7. Antonelli, J., Lindino, C., de Azevedo, J., de Souza, S., Cremonez, P. and Rossi, E., 2016. Biogas production by the anaerobic digestion of whey. *Revista de Ciências Agrárias*, 39(3), pp.463-468.
8. Baldasso C, Barros TC, Tessaro IC. (2011). Concentration and purification of whey proteins by ultrafiltration. *Desalination*;278, pp:381-386.
9. Fox, P.F., Uniacke-Lowe, T., McSweeney, P.L.H., O'Mahony, J.A. (2015). Milk Proteins. In: *Dairy Chemistry and Biochemistry*. Springer, pp. 145-239.
10. Johnson, R., Mwaikambo, L. and Yucker, N., 2003. Biopolymers. Shrewsbury: ISmithers Rapra Pub., pp.3-4.
11. Wagh, Y., Pushpadass, H., Emerald, F. and Nath, B., 2013. Preparation and characterization of milk protein films and their application for packaging of Cheddar cheese. *Journal of Food Science and Technology*, 51(12), pp.3767-3775.
12. Gennadios, A. (2004) "Edible films and coatings from proteins, *Proteins in Food Processing*", Woodhead Publishing, Cambridge, 442-467.
13. Maryam Adilah, Z., Jamilah, B. and Nur Hanani, Z., 2018. Functional and antioxidant properties of protein-based films incorporated with mango kernel extract for active packaging. *Food Hydrocolloids*, 74, pp.207-218.
14. Calva-Estrada, S., Jiménez-Fernández, M. and Lugo-Cervantes, E., 2019. Protein-Based Films: Advances in the Development of Biomaterials Applicable to Food Packaging. *Food Engineering Reviews*, 11(2), pp.78-92.
15. Chen, H., Wang, J., Cheng, Y., Wang, C., Liu, H., Bian, H., Pan, Y., Sun, J. and Han, W., 2019. Application of Protein-Based Films and Coatings for Food Packaging: A Review. *Polymers*, 11(12), p.2039.
16. Kalhor, P. and Ghandi, K., 2019. Deep Eutectic Solvents for Pretreatment, Extraction, and Catalysis of Biomass and Food Waste. *Molecules*, 24(22), p.4012.
17. Hammond, O., Bowron, D. and Edler, K., 2016. Liquid structure of the choline chloride-urea deep eutectic solvent (reline) from neutron diffraction and atomistic modelling. *Green Chemistry*, 18(9), pp.2736-2744.
18. Verpoorte, R., Witkamp, G. and Choi, Y., 2021. Chapter Thirteen - Applications of NADES in stabilizing food and protecting food compounds against oxidation- *Advances in Botanical Research*,. 97th ed. Academic Press, pp.333-359.
19. Migliorati, V., Sessa, F. and D'Angelo, P., 2019. Deep eutectic solvents: A structural point of view on the role of the cation. *Chemical Physics Letters*, 737, p.100001.
20. Koutsoukos, S., Tsiaka, T., Tzani, A., Zoumpoulakis, P. and Detsi, A., 2019. Choline chloride and tartaric acid, a Natural Deep Eutectic Solvent for the efficient

- extraction of phenolic and carotenoid compounds. *Journal of Cleaner Production*, 241, p.118384.
21. Hammond, O., Bowron, D., Jackson, A., Arnold, T., Sanchez-Fernandez, A., Tsapatsaris, N., Garcia Sakai, V. and Edler, K., 2017. Resilience of Malic Acid Natural Deep Eutectic Solvent Nanostructure to Solidification and Hydration. *The Journal of Physical Chemistry B*, 121(31), pp.7473-7483.
  22. Pereira, P. and Andrade, C., 2017. Optimized pH-responsive film based on a eutectic mixture-plasticized chitosan. *Carbohydrate Polymers*, 165, pp.238-246.
  23. Pontillo, A., Koutsoukos, S., Welton, T. and Detsi, A., 2021. Investigation of the influence of natural deep eutectic solvents (NaDES) in the properties of chitosan-stabilised films. *Materials Advances*, 2(12), pp.3954-3964.
  24. Tomé, L., Baião, V., da Silva, W. and Brett, C., 2018. Deep eutectic solvents for the production and application of new materials. *Applied Materials Today*, 10, pp.30-50.
  25. Tzani, A., Kalafateli, S., Tatsis, G., Bairaktari, M., Kostopoulou, I., Pontillo, A. and Detsi, A., 2021. Natural Deep Eutectic Solvents (NaDESs) as Alternative Green Extraction Media for Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *Sustainable Chemistry*, 2(4), pp.576-599.
  26. Craveiro, R., Aroso, I., Flammia, V., Carvalho, T., Viciosa, M., Dionísio, M., Barreiros, S., Reis, R., Duarte, A. and Paiva, A., 2016. Properties and thermal behavior of natural deep eutectic solvents. *Journal of Molecular Liquids*, 215, pp.534-540.
  27. Farooq, M., Abbasi, N. and Anderson, J., 2020. Deep eutectic solvents in separations: Methods of preparation, polarity, and applications in extractions and capillary electrochromatography. *Journal of Chromatography A*, 1633, p.461613.
  28. Wagh, Y., Pushpadass, H., Emerald, F. and Nath, B., 2013. Preparation and characterization of milk protein films and their application for packaging of Cheddar cheese. *Journal of Food Science and Technology*, 51(12), pp.3767-3775.
  29. Perez-Gago, M., Nadaud, P. and Krochta, J., 1999. Water Vapor Permeability, Solubility, and Tensile Properties of Heat-denatured versus Native Whey Protein Films. *Journal of Food Science*, 64(6), pp.1034-1037.
  30. Stefanescu, R., Brebu, S., Matei, M., Risca, I., Surleva, A. and Drochioiu, G., 2017. Contribution to Casein Determination by UV Spectrophotometry. *Acta Chemica Iasi*, 25(2), pp.112-126.
  31. Ozdemir, M. and Floros, J., 2008. Optimization of edible whey protein films containing preservatives for water vapor permeability, water solubility and sensory characteristics. *Journal of Food Engineering*, 86(2), pp.215-224.
  32. Valentas, K., Rotstein, E. and Singh, R., 1997. *Handbook of food engineering practice*. Boca Raton, Fla.: CRC Press. pp. 348-366.
  33. Benbettaïeb, N., Debeaufort, F. and Karbowiak, T., 2018. Bioactive edible films for food applications: mechanisms of antimicrobial and antioxidant activity. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(21), pp.3431-3455.
  34. Embuscado, M. and Huber, K., 2009. *Edible films and coatings for food applications*. Dordrecht: Springer, pp.211-244.
  35. Simone H. Flôres, Alessandro de O. Rios, Aline O.S. Iahnke, Camila de Campo, Carolina G. Vargas, Cassandra D.M. Santos, Karine dos S. Caetano, Liana Stoll, Tainara de M. Crizel, 2017, *Films for Food From Ingredient Waste*, Reference Module in Food Science, Elsevier, pp.1-40.
  36. Galvis-Sánchez, A., Castro, M., Biernacki, K., Gonçalves, M. and Souza, H., 2018. Natural deep eutectic solvents as green plasticizers for chitosan thermoplastic

- production with controlled/desired mechanical and barrier properties. *Food Hydrocolloids*, 82, pp.478-489.
37. Ptiček Siročić, A., 2017. Characterization of Casein Fractions – Comparison of Commercial Casein and Casein Extracted from Cow's Milk. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly Journal*, 30(4), pp.501-509.
  38. Correding, M., 2009. Dairy-derived ingredients. New York: CRC, pp.675-690.
  39. Qu, W., Häkkinen, R., Allen, J., D'Agostino, C. and Abbott, A., 2019. Globular and Fibrous Proteins Modified with Deep Eutectic Solvents: Materials for Drug Delivery. *Molecules*, 24(19), p.3583.

## Παράρτημα



Σχήμα Α: Φάσμα FTIR (ATR) του γφιλμ καζεΐνης με πλαστικοποιητή εκχύλισμα χαμομηλιού από DES Bet-Gly-W 1:2:1 (F26)